



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
Ano 2012

**Celestina Gomes  
Lopes**

**ANÁLISE DA HISTONA H2A TIPO 2-C NA  
DIFERENCIAÇÃO CELULAR E NO CANCRO DA  
MAMA**



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
**Ano 2012**

**Celestina Gomes  
Lopes**

**ANÁLISE DA HISTONA H2A TIPO 2-C NA  
DIFERENCIAÇÃO CELULAR E NO CANCRO  
DA MAMA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Luisa Alejandra Helguero Investigadora auxiliar e de Doutor Francisco Amado do Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro:

FCT projeto I&D  
PTDC/SAU-  
ONC/118346/2010

## **O júri**

Presidente

**Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Bruno Neves**  
Professor do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Luisa Alejandra Helguero**  
Investigadora auxiliar Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado**  
Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Aos meus orientadores, Doutora Luisa Alejandra Helguero e Doutor Francisco Amado, agradeço a disponibilidade prestada e a motivação dada para obter resultados até ao final da tese.

À Doutoranda Cândida Zita Cotrim, agradeço toda a disponibilidade e ajuda prestada no trabalho laboratorial.

A todos os meus amigos e amigas, pela força em todos os momentos que precisei e pela amizade sincera.

A minha mãe, Cristina Gomes, pelo incentivo e apoio incondicional, pelas oportunidades, por todo o amor e carinho e por ser exemplo de coragem, honestidade e perseverança. As minhas irmãs, pelo carinho e amizade.

**Palavras-chave** Glândula mamária, epigenética, histonas, cancro da mama, células epiteliais, diferenciação.

**Resumo** A glândula mamária é um órgão secretor complexo cujo desenvolvimento morfológico e funcional produz-se logo ao nascimento e em estádios bem definidos, a saber: a puberdade, a gravidez e lactação. O presente estudo teve como objetivo analisar a expressão de histona H2A tipo 2-C nas células epiteliais de rato doméstico HC11 durante o processo de diferenciação, e nas células do cancro de mama humano MDA-MB-231. O nível de expressão de histona H2A tipo 2-C estudou-se com as técnicas de Western Blot e imunohistoquímica. Com este fim, primeiro, procedeu-se à validação do anticorpo utilizando histona H2A tipo 2-C recombinante. Logo, analisaram-se células HC11 em fase de proliferação / pouco diferenciadas (SC-L), pré-diferenciadas (PD) e funcionalmente diferenciadas (DIF), bem como das células do cancro da mama MDA-MB-231 pouco diferenciadas e tecido mamário de rato doméstico. Foi observado a expressão de histona H2A tipo 2-C apenas no estágio SC-L em células HC11, e em células do tecido mamário do rato doméstico apenas no estágio de prenhez caracterizado por alta proliferação. Histona H2A tipo 2C também foi detetada em células de cancro MDA-MB-231. Os estádios caracterizados pelo expressão de histona estão associados a ativação das vias MEK  $\frac{1}{2}$  / ERK  $\frac{1}{2}$  MAPkinase e PI3K / AKT pelo recetor de fator de crescimento epidérmico. A via p38-MAPcinase também é alvo de ativação nestas células. Procedeu-se ao uso de inibidores destas vias: UO126 (inibidor MEK  $\frac{1}{2}$ ), LY294002 (inibidor PI3K) e SB203580 (inibidor p38) para avaliar o efeito das mesmas sobre a expressão de histona H2A tipo 2-C. A expressão de histona resultou ser dependente do funcionamento das três vias. Os resultados indicam que a histona H2A tipo 2-C é ativada pelas vias MEK  $\frac{1}{2}$  / ERK  $\frac{1}{2}$ , PI3K/AKT e p38-MAPcinase em células pouco diferenciadas em ativa proliferação e apontam à análise expressão da mesma como futuro alvo de estudos para identificar marcadores de progressão no cancro da mama.

**keywords**

Mammary gland, epigenetics, histones, breast cancer, epithelial cells, differentiation.

**abstract**

The mammary gland is a complex secretory organ whose functional and morphological development takes place after birth and at well-defined stages, namely: puberty, pregnancy and lactation. The present study aimed to analyze the expression of histone H2A type 2-C in mouse mammary epithelial cells during the differentiation process, and in human breast cancer MDA-MB-231 cells. The level of expression of histone H2A type 2-C was studied with the techniques of Western blot and immunohistochemistry. To this end, first, we proceeded to validate the antibody using recombinant histone H2A type 2-C. Next, we examined HC11 cells in stages of proliferation/poor differentiation (SC-L), pre-differentiation (PD) and functional differentiation (DIF); the breast cancer cells MDA-MB-231 and mouse mammary tissue were also analyzed. We observed the expression of histone H2A type 2-C only in HC11 cells in stage SC-L, and in cells of mammary tissue only at pregnancy, which is characterized by high epithelial proliferation. Histone H2A type 2-C was also detected in MDA-MB-231 cancer cells. The stages where the histone was detected are characterized by activation MEK  $\frac{1}{2}$  / ERK  $\frac{1}{2}$  MAP kinase and PI3K / AKT pathways by epidermal growth factor receptor. The p38-MAP kinase pathway is also a target in these cells. Therefore, we used inhibitors of these pathways: UO126 (MEK inhibitor  $\frac{1}{2}$ ), LY294002 (PI3K inhibitor) and SB203580 (p38 inhibitor) to evaluate the effect on the expression of histone H2A type 2-C. The expression of the histone resulted to be dependent on the action of the three ways. The results indicate that histone H2A type 2-C is activated by MEK $\frac{1}{2}$  / ERK  $\frac{1}{2}$ , PI3K/AKT and p38-MAP kinase pathways in undifferentiated cells undergoing active proliferation. Therefore, studies on the expression of histone H2A type 2-C should be continued with the aim to identify progression markers in breast cancer.

# 1 Índice

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>2 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
2.1 Glândula mamária.....	1
2.2 Cancro da mama .....	3
2.2.1 Tipo de cancro de mama .....	7
2.3 Células estaminais e cancro .....	9
2.4 Alterações epigenéticas .....	10
2.5 Tipos de histonas associados ao cancro de mama .....	19
2.6 Vias de sinalização envolvidas na proliferação e diferenciação celular .....	23
2.6.1 A via MEK ½ / ERK ½ .....	24
2.6.2 A via da PI3K/AKT.....	26
2.6.3 A via da P38-MAPK .....	27
2.6.4 A via JAK2/STAT .....	29
2.7 Modelo de estudo .....	31
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivos específicos.....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Cultura de células.....	34
4.2 Extração de proteínas totais .....	34

4.3	Extração proteína da fração nuclear.....	35
4.4	Quantificação proteica .....	35
4.5	Western blotting .....	36
4.6	Imunocitoquímica .....	37
4.7	Imunohistoquímica .....	38
4.8	Análise de dados .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
5.1	Confirmação do modelo experimental usado para estudo de diferenciação .....	40
5.2	Análise da expressão da histona H2A tipo 2-C na proliferação e diferenciação de células epiteliais de mama HC11. ....	42
5.3	Análise da expressão da histona H2A tipo 2-C em tecido mamário do camundongo. ....	45
5.4	Importância das vias de sinalização ERK½ MAP Kinase, p38- MAP Kinase e via PI3K/AKT na regulação da expressão histona H2A tipo 2-C MAP Kinase em células epiteliais mamárias. ....	47
5.5	Expressão de histona H2A tipo 2-C em células de cancro de mama humana. ....	49
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>





## LISTA DE ABREVIATURAS

AKT- Proteína kinase B

BRCA – Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog (Gene associado ao cancro da mama familiar)

BSA- Albumina de soro bovino

CDKN2A – Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Ciclina-dependente inibidor da quinase 2A)

CpG- Citosina – Fosfato – Guanidina

CSCs – Cancer Stem Cell( Cancro de células estaminais)

c-Src – Tirosina kinase celular do vírus do Sarcoma de Rous vírus.

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferases (metiltransferases de DNA)

DAB – Diaminobenzidina

EGF – Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)

EGFR- Epidermal growth factor receptor (recetor de fator de crescimento epidermal)

EMT- Epithelial- mesenchymal transition

ERBB2 – Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (Receptor de tirosina cinasa erbB2)

ERK- Kinase regulada por sinal extracelular.

ER – Estrogen receptor (Recetor de estrogénio)

FBS – Soro Fetal Bovino

H- Histona

HC11- Linha células derivado do epitélio mamário do Camundongo

HDAC – Histona Desacetilase

HP1 – Heterochromatin protein 1 (Proteína heterocromatina 1)

JAK – Janus kinase

K- Lisina

Ly294002 - Inibidor de PI3K

MAPK- proteínas Kinases ativadas por mitógenos

MBD – Methyl Binding Domain Proteins

MDA-MB-231 - Células do cancro de mama  
MEK- Proteína kinase ativada por mitógeno.  
NF-κB - Fator de transcrição nuclear κB  
RNA – Ácido Rribonucleico  
SB20580- Inibidor de p38 kinase  
SCs – Stem Cells (Células estaminais)  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
STATs -*Signal Transducers and ativator of Transcription*( transdutor de sinal e ativador de transcrição)  
PBS - Tampão fosfato salino  
PCR2- Complexo repressor polycomb 2  
PI3K - Fosfatidil-inositol 3-quinasa  
PTM – Postranslational modifications (Modificações Pós-Traducionais)  
PRL- Prolactina  
TDLU – Terminal ductal-lobular units (Unidade Terminal Ducto – Lobular)  
UO126 - Inibidor de MEK½  
VEGF- Fator de Crescimento de endotélio e vasos.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de risco de cancro de mama .....	4
Tabela 2. Modificações pós-traducionais de histonas.....	14
Tabela 3. Anticorpo primários utilizados para ensaios de Western Blot.....	37
Tabela 4. O anticorpo secundários utilizados para os ensaios de Western Blot. ....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da glândula mamária .	3
Figura 2: A glândula mamária humana.	5
Figura 3. Esquema de várias etapas da carcinogénese em cancro de mama.	8
Figura 4. Esquema de modificações epigenéticas.	11
Figura 5. Representação esquemática de metilação como mecanismo de inativação génica.....	12
Figura 6. Modificações pós-traducionais nas caudas das histonas.....	15
Figura 7. Regulação da transcrição através da metila H3K27.....	17
Figura 8. A via de sinalização da Ras-Raf-MEK-ERK.....	25
Figura 9. Modelo da via da PI3K/AKT. ....	27
Figura 10. A ativação da via p38-MAPK por fator de crescimento .....	29
Figura 11. A via de sinalização JAK2/STAT5.....	31
Figura 12. Análise da expressão de STAT5 e Src-pSer416 nas células HC11 no estágio SC-L e DIF.....	41
Figura 13. Análise da ativação de STAT5 em células HC11 em estágio SC-L, PD e DIF.....	42
Figura 14. Especificidade do anti-histona H2 tipo 2-C na deteção na deteção por Western Blot.....	43
Figura 15. Expressão de histona H2A tipo 2-C em células HC11. ....	44
Figura 16: Análise de expressão de histona H2A tipo 2-C nas células HC11 C. ....	44

Figura 17: Análise de expressão de histona H2A tipo 2-C no tecido mamário de camundongo.....	46
Figura 18: Análise do efeito de UO126 na expressão de histona H2A tipo 2-C nas células HC11 .....	47
Figura 19. Os efeitos dos inibidores UO126 (1 µM) e LY294002 (3 µM) por 24h nas células HC11 + EGF. ....	49
Figura 20: A comparação da expressão da H2A tipo 2-C de amostras das células MDA-MB-231. ....	50
Figura 21: Análise de efeito de UO126 (inibidor de MEK ½), Ly294002 (inibidor de PI3K) e SB203580 (inibidor de p38 MAPK) na expressão de histona H2A2C nas células MDA-MB-231 .....	<u>51</u>
Figura 22: Os efeitos de inibição de MEK 1/2 e PI3K, pelos inibidores UO126 (1µM) e Ly294002 (3µM), respetivamente. ....	52



## **Introdução**

### **1.1 Glândula mamária**

A glândula mamária é um órgão secretor complexo, cujo desenvolvimento morfológico e funcional produz-se principalmente logo ao nascimento e em estádios bem definidos. Começa na puberdade, continua durante a gravidez e alcança seu maior grau de diferenciação funcional na etapa de lactação [1].

No início da puberdade, os seios são praticamente os mesmos entre homens e mulheres e sua estrutura interna é semelhante, composto por um conjunto de ramificação de ductos de origem epitelial, que terminam em ductos terminais com a formação de um pequeno lóbulo. A glândula mamária começa a desenvolver-se com o início da menarca feminino, o tecido mamário responde a libertação de hormonas sexuais femininos, o estrogénio e a progesterona. Estas hormonas estimulam a formação de lóbulos a partir dos ductos terminais pré-existent, designada unidade terminal ducto-lobular (TDLU) (Figura 2). Este processo leva ao aumento do volume e elasticidade do tecido conjuntivo, a deposição de tecido adiposo e o aumento da vascularidade [2].

Durante o período da gravidez, devido a grande quantidade da progesterona secretada pela placenta, existe a promoção do crescimento e ramificação do sistema de ductos das mamas. No entanto, a hormona de crescimento, a prolactina, os glucocorticóides supra-adrenais e a insulina, igualmente são importantes para o crescimento do sistema de ductos. A progesterona desempenha um papel importante no desenvolvimento do sistema lóbulo-alveolar. A progesterona ao atuar em sinergia com estrogénio, mas também com outras hormonas anteriormente mencionadas, promovem o crescimento dos lóbulos, desenvolvimento dos alvéolos e o aparecimento das células alveolares e sua diferenciação [3].

Dois compartimentos celulares contribuem para formação da glândula mamária. São eles os epitélios e o estroma, podendo ser identificados quando as células epiteliais de origem ectodérmica projetam no mesênquima subjacente ao sulco mamário e formam os ductos lactíferos[1]. A glândula mamária é composta

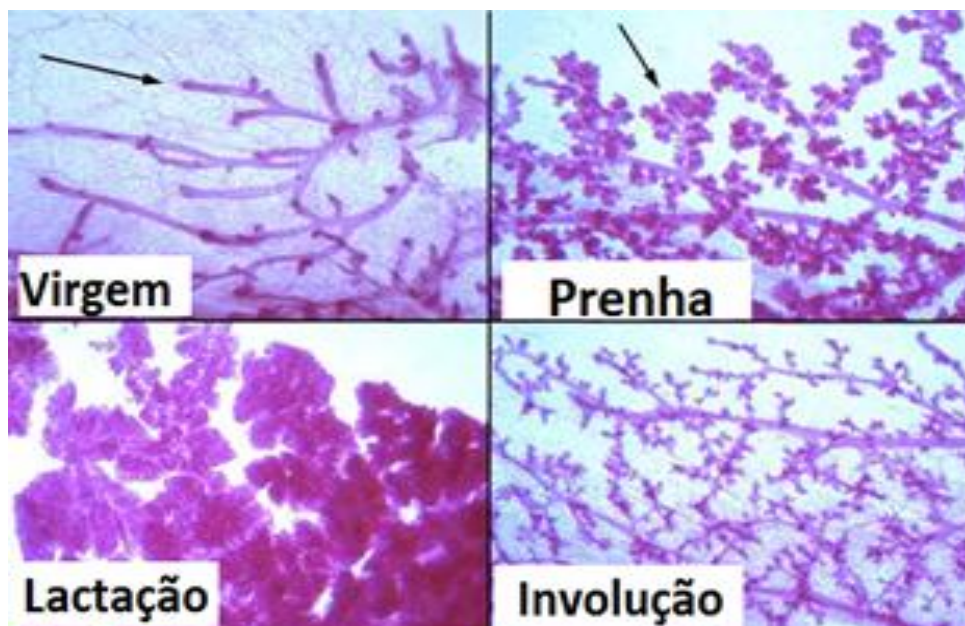


de várias linhagens de células epiteliais incluindo células luminais, alveolares e mioepiteliais. No pós-natal, as linhagens celulares da glândula mamária, diferenciam-se de células estaminais de vida longa (*mammary stem cell*: MSC) que exibem extensamente a capacidade de renovação e expansão clonal durante a morfogénese na vida adulta, permitindo assim repetidos ciclos de desenvolvimento durante a vida reprodutiva [4, 5]. As MSCs dão origem as células progenitoras que desempenham funções de auto-renovação e diferenciação de linhagem multicelulares que podem remodelar a arquitetura túbulo-lobular da mama.

Alterações hormonais ocorrem durante o início da gravidez - uma fase cíclica do desenvolvimento em que há uma transição da glândula de morfologia ductal para predominantemente lóbulo-alveolar. Células progenitoras lóbulo-alveolar localizadas dentro dos ductos proliferam e diferenciam-se para formar os alvéolos [6]. Durante a segunda metade da gravidez os ductos alveolares dividem-se e diferenciam-se dos alvéolos, que são as unidades funcionais para a produção e secreção do leite. Estas estruturas possuem uma camada de células epiteliais luminais e uma camada de células mioepiteliais basais. As células luminais dos alvéolos serão logo as produtoras de leite e as mioepiteliais funcionaram como elementos contracteis para promover sua expulsão para o exterior.

Após a lactação a glândula mamária sofre um processo de regressão denominado involução (apoptose), deixando-a em estado semelhante a pré-gravidez (Figura 1) [7]. A existência de MSCs e células progenitoras mamárias é fundamental para o processo de remodelação da mama nos sucessivos ciclos reprodutivos.

Com a idade avançada, as mulheres especialmente com a diminuição de estrogénio na menopausa, os lóbulos inativos em algumas áreas desaparecem, permanecendo apenas os ductos. O componente conjunto fibroso do estroma também diminui, enquanto aumenta a estroma e acumulação de tecido adiposo [2].



**Figura 1:** Estrutura da glândula mamária durante o desenvolvimento pós-natal. Observa-se árvore de ductos numa virgem adulta (seta assinala um broto terminal). Durante a gravidez observa-se o desenvolvimento das estruturas lóbulo-alveolares (seta) que aumentam até alcançar sua máxima diferenciação e tamanho durante de lactação onde encontram-se encolhidas de leite. Durante a involução, a mama regressa ao estado similar ao de uma virgem, embora ligeiramente mais ramificada e com alguns alvéolos. Adaptado de (<http://mammary.nih.gov>).

## 1.2 Cancro da mama

O cancro da mama é frequentemente mais diagnosticado em mulheres no mundo ocidental. Estima-se o aparecimento de 1.4 milhão de novos casos, e 458.000 mortes em 2008[8]. Esta doença afeta não só a taxa de sobrevivência dessas mulheres, mas também seu estado psicológico e bem-estar físico, influenciando também as pessoas que com elas possuem uma relação de proximidade. O cancro da mama é uma doença extremamente heterogênea, apresenta uma grande variabilidade clínica, histopatológica e molecular [9].

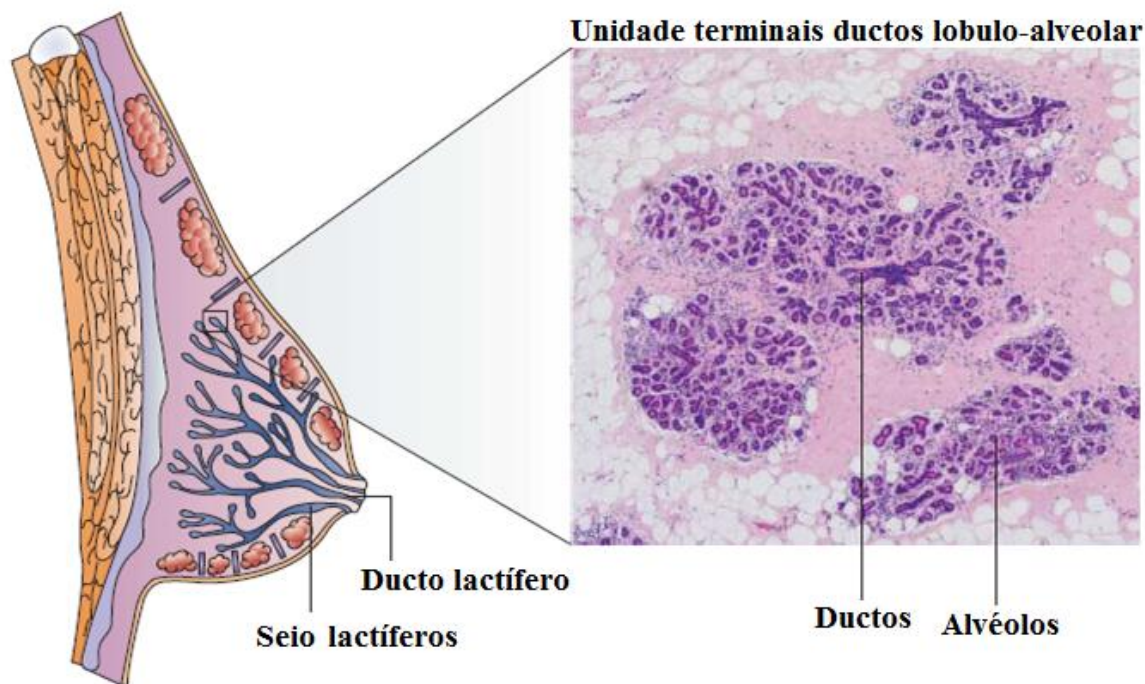
A sua etiologia é complexa devido a componentes multifatoriais tanto exógenos quanto endógenos, bem como outros fatores de risco que diminuem e/ou influenciam o desenvolvimento desta doença (Tabela 1) [10]. Porém, a prevenção primária deste cancro ainda não é totalmente possível, pois fatores de

risco ligados à vida reprodutiva da mulher e características genéticas estão envolvidos em sua etiologia[11].

**Tabela 1.** Fatores de risco do cancro da mama

<b>Fatores de Risco</b>	<b>Efeito</b>
Aumento da idade	↑↑
Menarca precose	↑
Menopausa tardia	↑↑
Nuliparidade	↑
Tenra idade de primeira gravidez	↓↓
Amamentação	↓
Nível sérico elevado de hormonas sexuais (estradiol, prolactina, hormona de crescimento e insulina)	↑↑
Terapia de reposição hormonal (HRT) prolongada	↑
Historial de doença benigna de mama	↑↑
Alta densidade de mama	↑↑
Obesidade na pós-menopausa	↑
Atividade física	↓
Ingestão de gordura e comida mal feita	↑
Consumo de Frutas, hortaliças e legumes	↓
Consumo de álcool	↑
Exposição a radiação (criança e jovem adulto)	↑↑
Histórico familiar	↑↑
Mutação em genes de elevada penetração (BRCA1, BRCA2, TP53, ATM)	↑↑

Legenda: ↑- Aumento de risco baixa a moderado; ↑↑- Aumento de risco moderado a alto;  
 ↓ - Diminuição de risco baixo a moderado; ↓↓- Diminuição de risco moderado a alto.



**Figura 2:** A glândula mamária humana. Esquema da estrutura do epitélio da mama humano com uma fotomicrografia de hematoxilina eosina-mancado e secção transversal através da unidade terminal ductal lóbulo-alveolar. São compostas por células ductais e alveolares. Acredita-se que nestas unidades surgem a maioria dos tumores de mama. Adaptado de Smalley et al [12]

De acordo com a Sociedade Americana de Cancro (ACS), o cancro de mama diagnosticado em estádios iniciais, pode ser tratado com cirurgia convencional e estimam-se as taxas de sobrevivência (livre de doença) em 5 anos, para pacientes com doença local e sem envolvimento metastático dos linfonodos axilares são superiores a 95%. Em caso de disseminação local da doença, as taxas de sobrevivência diminuem para 83%. Entretanto, quando há presença de metástases em outros órgãos, as taxas de sobrevivência diminuem drasticamente, passando para aproximadamente 26% [13].

A progressão de cancro da mama pode ser afetada por diversos fatores expressos nas células tumorais e por fatores microambientes envolvidos na sua progressão tecidual [11]. Existem diversos tratamentos contra o cancro de mama,

que incluem as cirurgias (tumorectomia, mastectomia), a radioterapia e a quimioterapia.

Em conceito geral do tumor, a variação genética é fornecida principalmente por mutações genéticas (e/ou modificações epigenéticas) e seleção natural, sendo que estes atuam sobre essa variação como uma forma de fornecer uma vantagem de sobrevivência aos fenótipos (genótipos) que melhor adaptam-se ao meio. O Crescimento do tumor, por comparação, é iniciado por uma ou geralmente mais mutações atribuídas por uma vantagem de crescimento seletivo a uma célula[14]. O clone é derivado de células que em seguida expandem-se. Sucessivas mutações úteis e/ou mudanças epigenéticas ocorrem, e pensa-se que cada uma delas é seguida por ondas de expansão clonal. Este modelo tem sido confirmado por numerosos estudos moleculares, sendo que a partir destes ficou estabelecido que as células têm de adquirir várias alterações genéticas para permitir o crescimento de tumores, invasão e metástase[14]. No entanto, a taxa de mutação normal é insuficiente para proporcionar a variação genética que é necessário para crescimento do tumor. Nesta linha, é muitas vezes proposto que as mutações que causam instabilidade genômica ocorrem como o início de eventos que constituem a força matriz para a tumorigênese[15].

A instabilidade é derivada de mutações em genes que estão envolvidos em processos tais como a reparação do DNA e segregação cromossômica, e as mutações nesses genes não têm nenhuma vantagem direta seletiva ou desvantagem. Apresentam apenas um efeito sobre as taxas de mutação de outros genes. A Instabilidade genômica pode surgir como um efeito adicional de uma mutação que tem uma maior vantagem seletiva direta. Do mesmo modo, ambientes mutagênicos podem favorecer células que ignoram mecanismos de baixo reparo do DNA, portanto, acelera o progresso através do ciclo celular[15] [16]. Sob estas condições de seleção, pode haver proliferação celular e aumento a taxa de mutação. Finalmente, a capacidade das mutações de instabilidade genômico poderiam "oscilar" com novas mutações vantajosas no mesmo genoma, desde que a vantagem seletiva para o total de células de tumor seja mantido.

O modelo de tumorigênese é também viável no órgão de mama. A transformação do epitélio na mama normal em carcinoma é geralmente aceita

como um processo de várias etapas, sendo que as mudanças genéticas/epigenéticas (em genes supressores de tumores e de oncogenes), de estilo de vida, fatores ambientais, e exposição a hormonas, podem desempenhar um papel importante, resultando em uma imagem muito complicada (Figura 3).

No entanto, o cancro da mama mais encerra uma origem, complexo heterogêneo e multifatorial. Uma consequência deste fenómeno indica que dois ou mais grupos de casos de cancro da mama podem ter sido causados por diferentes conjuntos de eventos, ou mesmo diferentes causas.

### **1.2.1 Tipo de cancro da mama**

Atualmente a classificação dos tumores da mama é feita em relação não só à morfologia da lesão, mas também ao seu perfil molecular [18]. Uma vasta variedade de doenças benignas e malignas de mama foram identificadas, mostrando a elevada complexidade e heterogeneidade da doença. Os tumores da mama mais comuns têm origem epitelial (cerca de 95% de todas as doenças da mama) [19], e podem ser divididos em três principais grupos: lesões benignas, carcinomas *in situ* e invasivo. Os tumores benignos podem ser definidas como tecido bem diferenciado, com origem de morfologia similar, geralmente com uma taxa de crescimento lento e áreas bem demarcadas de crescimento [19].

As lesões benignas podem ser divididos em: a) lesões não proliferativas, incluindo cistos, metaplasia apócrina e ectasia ductal; b) lesões proliferativas sem atipia, hiperplasia epitelial, adenose esclerosante, lesões esclerosantes/esclerosantes, papilomas e fibroadenoma e, c) lesões proliferativas com atipia, como hiperplasia lobular e ductal atípica [18, 19]. Diversos tipos de lesões benignas em mama humanos, apenas as hiperplasias atípicas parecem apresentar um fenótipo pré-malignas, que encerram uma perda relativa do controle do crescimento, no entanto, sem a capacidade de invadir e metástase, características restrita a lesões malignas [19]. Assim, os tumores malignos são caracterizados por níveis diminuídos de diferenciação celular apresentando uma perda de morfologia em relação ao tecido de origem, com o crescimento desordenado e as taxas de proliferação altas, núcleos anormais e diversas mitoses, com capacidade de invadir tecidos adjacentes e metástase para outros órgãos (Figura 3) [19].

Os carcinomas *in situ* são divididos principalmente em dois tipos: tipo ductal (*ductal carcinoma in situ*: DCIS) e lobular (*lobular carcinoma in situ*: LCIS). Ao contrário da proliferação do epitélio combinado com características celulares de malignidade, este tipo de cancro não possui capacidade de invadir o tecido adjacente. Estes dois tipos de carcinomas apresentam origem celular similar, como origem na unidade ducto-lobular terminal e alteração genética indistinguível em loci diferentes [20]. No entanto, apenas uma minoria dos casos LCIS parecem evoluir para a doença invasiva, contraste com carcinoma ductal *in situ*, o que representa um fator de risco elevado de progressão para carcinoma invasivo (Figura 3).

A maioria dos carcinomas invasivos é mencionada como ductal (85-95%), que abrange um grupo heterogêneo de tumores com nomes particulares, como tubular, medular, mucinoso, papilar, metaplásico, secretor, apócrinas e rica em lipídios, e outros classificados como "não-especificada" [19]. A abundância de carcinomas lobulares invasivos varia de 5-15% e é um grande grupo mais homogêneo.

Esta classificação morfológica foi definida em três grupos de cancro de mama que estão relacionados com diferentes características moleculares da biologia epitelial mamária: o recetor de estrogénio luminal (*estrogen receptor*: ER) positivo, o recetor do fator de crescimento epidérmico-2 (HER-2) positivo e o tipo basal ou triplo negativo (ER, recetor de progesterona e HER-2 negativo).



**Figura 3.** Esquema de várias etapas da carcinogénese em cancro da mama.



### 1.3 Células estaminais e cancro

As células estaminais (*Stem Cells*: SCs) são células, que possuem a capacidade de auto-renovação através da divisão celular mitótica e de produzir células filhas que se diferenciam em tipo de célula diferente. A definição clássica de SCs requer que possuem duas propriedades: Auto-renovação a capacidade de passar por diversos ciclos de divisão celular, mantendo o estado indiferenciado; Potência - a capacidade de diferenciarem-se em tipos de células especializadas. No sentido mais estrito, isto requer células estaminais para ser ou totipotente ou pluripotentes - capaz de dar origem a qualquer tipo de células maduras, embora as células progenitoras multipotentes são por vezes referidas como SCs [21]

Segundo Dontu e seus colaboradores, a glândula mamária desenvolve através da diferenciação progressiva de SCs primitivas, produzindo os componentes celulares encontrados na glândula mamária adulto. A carcinogénese mamária resultaria da transformação destas células estaminais e/ou progenitoras, originando a heterogeneidade celular dentro de tumores[22].

As células estaminais do cancro (*Cancer Stem Cell*: CSCs) têm sido definidas como uma célula no interior do tumor, que possui a capacidade de auto-renovação e de provocar as linhagens de células cancerígenas que compõem o tumor heterogéneo. Estas células formadoras de tumor originam hipoteticamente a partir das células progenitoras ou células indiferenciadas mamárias tem sido alvo de eventos de transformação. Também é reconhecido que algumas células cancerígenas são capazes de alterar a sua morfologia e desenvolver fenótipo invasivo e separam-se do tumor primário para originar as metástases [23]. Esta característica chama-se transição epitélio mesenquimal ou EMT (*Epithelial-mesenchymal transition*) [24]. Os CSCs têm sido propostos como motor de metástase apoiada por acumulação de evidências que CSCs também expressam marcadores de EMT, e mais importante, a indução de EMT em células epiteliais transformadas promove a geração de CSCs. Além da auto-renovação e fenótipos EMT, CSCs também apresentam outras características de células-estaminais que são benéficas para sua adaptação a distintos microambientes e, eventualmente formar metástase. É evidente que várias propriedades únicas necessárias para



assegurar a extensão da longa vida de SCs normais, pode contribuir para a proteção de CSCs no microambiente adverso.

As células estaminais normais e do cancro de mama têm muitas características similares: 1) ambos têm habilidades de auto-renovação que SCs usam firmemente para controlar a capacidade de proliferação para organogêneses, manutenção de tecido adulto, reparação, e regeneração de tecidos; enquanto a auto-renovação descontrolada de CSCs poderia ser a causa da formação de tumor; 2), ambos podem diferenciar-se a partir de diferentes tipos de células específicas do tecido ou organogênese no caso de SCs e heterogeneidade no caso de CSCs; 3) ambos têm vias anti-apoptotica ativas e atividade telomerase, a qual resulta vida longa e alto risco de acumular mutações; 4) eles têm resistência a exposição a agentes nocivos. As SCs têm um aumento da atividade de transporte para excretar agentes tóxicos, enquanto CSCs prometem remover agentes quimioterapêuticos e tornar-se resistentes. Por último, ambos podem sobreviver independente de adesão a um substrato e migrar, o que dá as células cancerosas a capacidade de metástase [22].

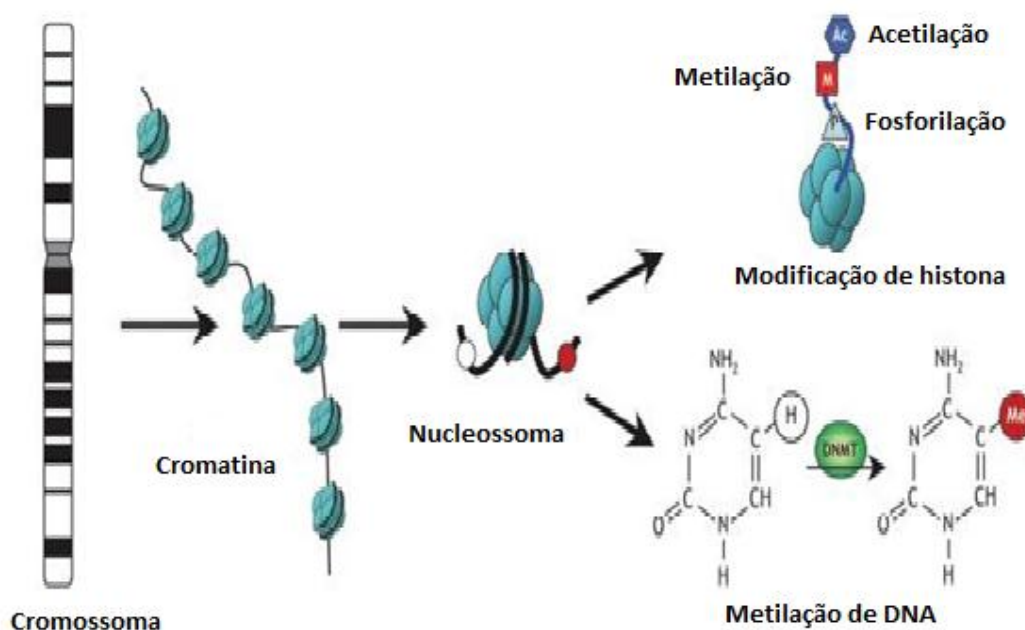
A regulação de auto-renovação e diferenciação de células estaminais é baseado no equilíbrio entre as vias de sinalização e diversos fatores, como o ambiente. Compreender as vias envolvidas na regulação de auto-renovação e diferenciação serão importantes para estabelecer a relação entre as SCs da mama e tumorigênese e nos direciona para novas abordagens terapêuticas.

#### **1.4 Alterações epigenéticas**

A epigenética é o termo aplicado ao estudo de alterações estáveis, reversíveis e hereditárias na expressão gênica, que não envolvem alterações na sequência de DNA [25]. Atualmente, diversos estudos demonstram que as modificações epigenéticas têm um papel essencial no desenvolvimento normal, na manutenção do tecido específico e no padrão da expressão gênica, bem como na carcinogênese. As principais alterações epigenéticas que surgem durante o desenvolvimento do tumor são anomalias na metilação (hipermetilação) de genes supressores de tumor e modificações das histonas na cromatina (Figura 4) [26]. Além disso, alterações como a hipometilação genômica global, a hipometilação gene específica de oncogenes e perda de “imprinting” (fenômeno genético no qual

certos genes são expressos apenas por um alelo, enquanto o outro é metilado ou inativado) [27, 28] também são dignas de menção.

Ao contrário das mutações genéticas, as alterações epigenéticas são reversíveis, tornando-se numa das alternativas mais promissoras e seguras na terapia do cancro, incluindo o da mama [29].

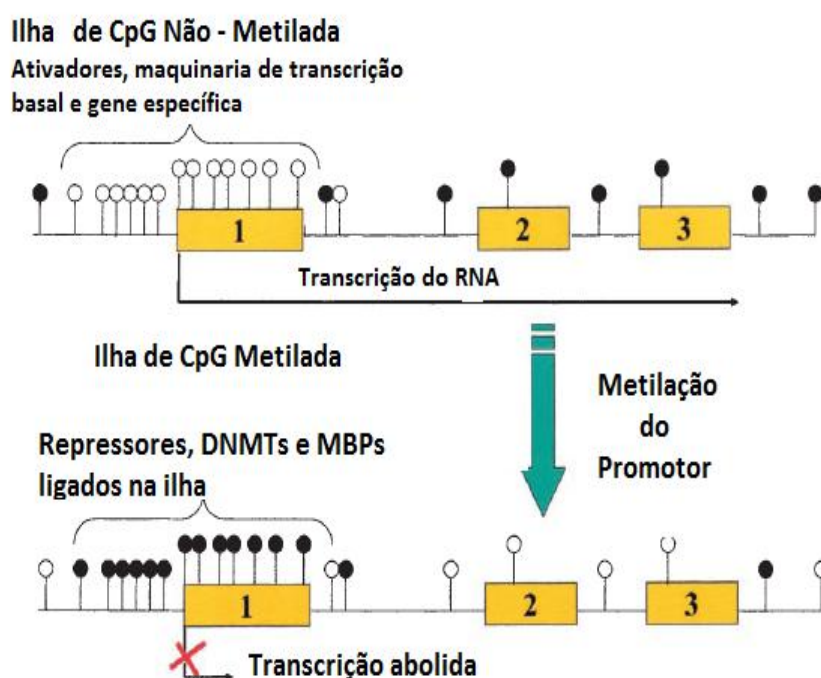


**Figura 4.** Esquema de modificações epigenéticas. As cadeias de DNA são enroladas à volta de octâmeros histonas formando nucleossomas. As modificações reversíveis das histonas ocorrem em vários sítios através de metilação, acetilação e fosforilação. A metilação do DNA ocorre nas posições 5 de resíduos de citosina numa reação catalisada pela DNA metiltransferases (DNMTs) [30]

**Modificação do DNA:** A metilação do DNA ocorre na adição covalente de um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) em posição C-5 de citosina, principalmente no contexto do dinucleotídeo CpG. Esta reação química é catalisada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) [31]. A DNMT1 é a responsável pela manutenção do padrão de metilação pré-existente durante a replicação do DNA, enquanto que as DNMT3a e DNMT3b participam na metilação de novo do DNA [25]. A atividade das DNMTs regula a expressão génica global por hipermetilação do promotor nas

ilhas-CpG, estando associadas com a perda de replicação do DNA, condensação de cromatina e inativação da transcrição. O padrão de metilação do DNA é modificado na diferenciação celular e no cancro. De modo geral, a presença de metilação nas ilhas-CpG nas sequências promotoras dos genes, pode ser correlacionada com o silenciamento génico (Figura 5) [32].

A desregulação de metilação do DNA é observada nas células do cancro causando o silenciamento genético. Desta forma, as células tumorais apresentam hipermetilação global do genoma e aumento dos níveis da expressão de DNMT1. Além disso, tanto a hipometilação como a hipermetilação ocorrem em loci de genes específicos levando à sobre-expressão de oncogenes e silenciamento dos genes supressores tumorais, respetivamente [25]. Um exemplo é a expressão do gene de resposta ao dano no DNA (BRCA1), e o gene da proteína de adesão celular E – Cadherina (CDH1) que é suprimido durante a EMT. Estes genes sofrem hipermetilação no carcinoma mamário e em outros cancros [33].



**Figura 5.** Representação esquemática de metilação como mecanismo de inativação génica. As caixas amarelas representam os exões do gene, os círculos representam dinucleotídeos CpG e os círculos pretos representam a presença do

grupo metilo na citosina. Os círculos brancos indicam ausência daquele grupo [32].

**Modificação de histonas:** Nas células eucarióticas, o DNA é compactado em cromatina e essa pode estar organizada em heterocromatina, com baixa atividade transcripcional ou em eucromatina ativa. O nucleossoma (Figura 4) é a unidade básica da cromatina, composta por duas moléculas de histonas H2A, H2B, H3 e H4. Ao redor de cada octâmero de histonas são envolvidos 147 pares de nucleótidos de DNA. Existem inúmeras modificações pós-traducionais envolvendo as histonas, sendo mecanismos epigenéticos no controle da expressão gênica [34].

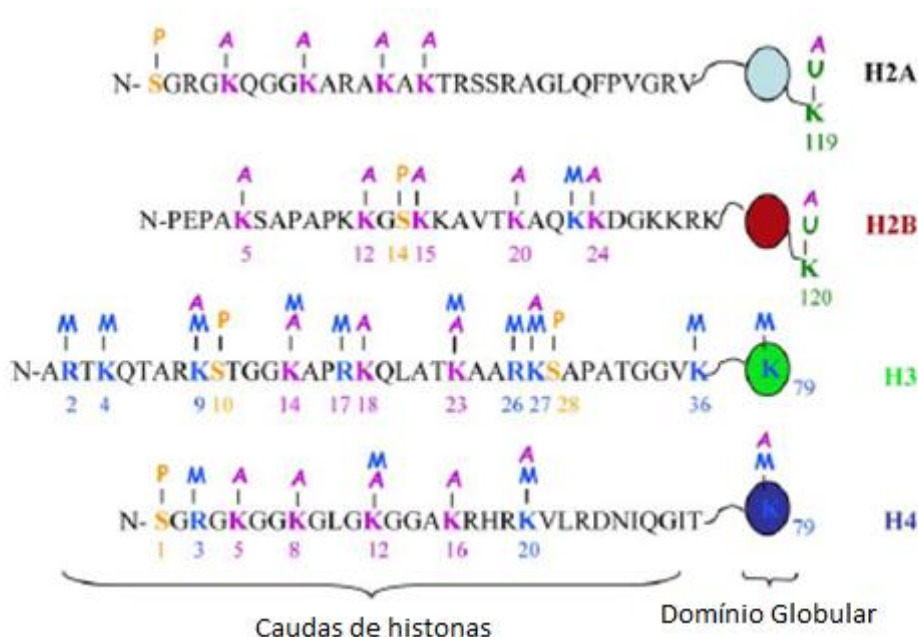
Existem pelo menos oito tipos distintos de modificações encontradas em histonas. As mais conhecidas são: a acetilação, a metilação e a fosforilação. A metilação de lisina (K) pode ocorrer nas formas mono-di- ou tri-metilada, enquanto a metilação da arginina (R) ocorre nas formas mono- e di-metilada [35]. As modificações das histonas são dinâmicas e modificam-se rapidamente em resposta a estímulos celulares. Foram identificadas as enzimas responsáveis por estas modificações de histonas (alguns exemplos são apresentados na

Tabela 2) [36] bem como muitas enzimas que removem as modificações como fosfatases, histonas desacetilases (HDAC) e histonas demetilases (HDM), permitindo a contínua remodelação do nucleossoma [37].

**Tabela 2.** Modificações pós-traducionais de histonas. Tipos de modificações, resíduos de aminoácidos que se modificam, funções reguladas e exemplos de enzimas implicadas na modificação [34, 36]. ac, acetilação; me, metilação; ph, fosforilação; ub, ubiquitinação; su, sumoilação; ar, ADP-ribosilação. K-lisina, R-arginina, S-Serina, T-tirosina e P-prolina.

<b>Modificações</b>	<b>Resíduos modificados</b>	<b>Função</b>	<b>Enzimas</b>
<b>Acetilação</b>	K-ac	Transcrições (ativação), Reparação, replicação	Lisina acetil transferases (KATs) e.g. PCAF, CBP, p300, TIP60
<b>Metilação (lisina)</b>	K- me1, K-me2, K-me3	Transcrições (ativação ou repressão), reparação	Lisina metil-transferases (KMTs) e.g. MLL1, SET1
<b>Metilação (Arginina)</b>	R- me1, R-me2	Transcrição (ativação ou repressão)	Arginina metil transferases e.g. PRMT, CARM1
<b>Fosforilação</b>	S-ph, T-ph	Transcrição (ativação), reparação, condensação	Serina/treonina cinases e.g. MSK1, Mst1, CKII
<b>Ubiquitinação</b>	K-ub	Transcrição (ativação ou repressão)	Ubiquitilase e.g. UbcH6
<b>Sumoilação</b>	K-su	Transcrição (repressão)	
<b>ADP-ribosilação</b>	E-ar	Transcrição	PARPs (poli ADP Ribose Polimerase)
<b>arginina&gt;citrulina</b>	R> Cit	Transcrição(repressão)	PAD14
<b>Isomerização de prolina</b>	P-cis>P-trans	Transcrição(repressão)	Prolil-isomerase

As histonas têm um papel crucial na regulação de processos dinâmicos da cromatina. A transcrição, a replicação, a reparação, a recombinação e o silenciamento podem ser controlados pela correção de nucleossomas no DNA através de diversas modificações pós-traducionais (PTMs), incluindo acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, e poli ADP- ribosilação (conforme se observa na Figura 6)



**Figura 6.** Modificações pós-traducionais nas caudas das histonas. As caudas de histonas podem ser metiladas em resíduos de lisina e arginina (azul), lisina acetilada (púrpura), fosforilação de serina (laranja), ubiquitinação (verde) [38].

Estas modificações pós-traducionais nas histonas são o ponto-chave na regulação epigenética e representam um conjunto complexo de informações com potencial de combinação conhecido como hipótese “Código de Histona”[38]. O código de histona fornece estrutura à cromatina [39] - controle adicional que dita os níveis da expressão gênica e isso é mediado principalmente através da interação proteica. Em combinação com o código do DNA, o código das histonas

fornece uma rede sinalizadora de enorme complexidade, permitindo assim que a expressão génica seja modulada.[40]

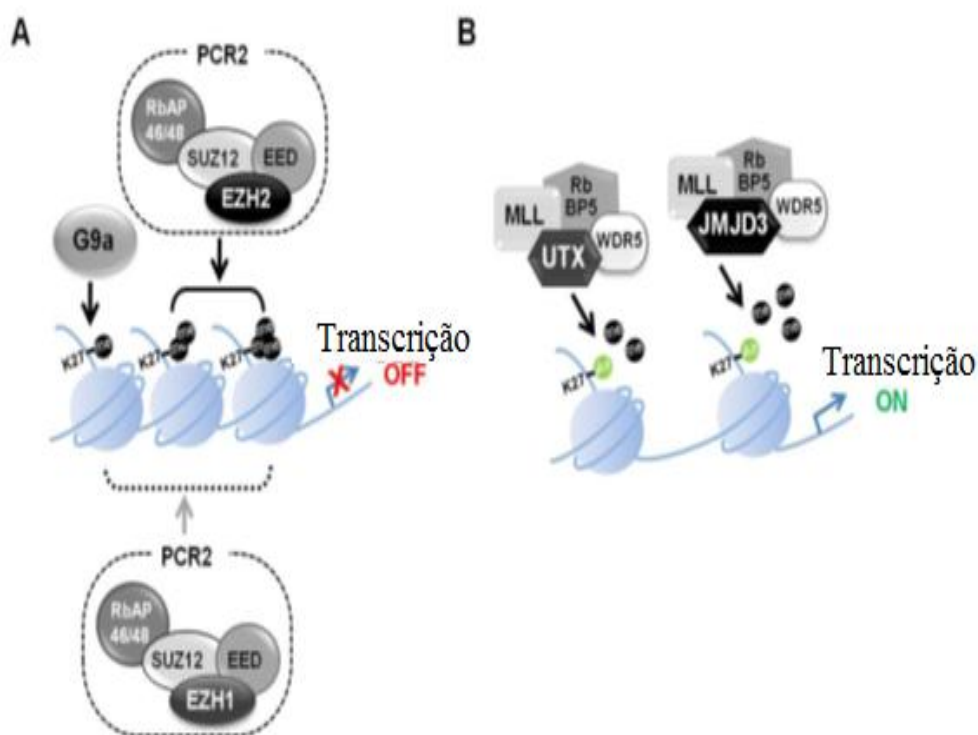
As modificações epigenéticas são controladas através de um mecanismo enzimático que inclui metilases e demetilases de histonas específicas. A desregulação deste mecanismo poderia alterar a configuração da cromatina e romper programas transcricionais e transformar a célula em célula cancerígena [41]. Estas modificações iniciam respostas biológicas a traves da ativação ou repressão da transcrição e condensação cromossómica [42]. Dos processos de modificação das histonas, o melhor caracterizado é o de acetilação/desacetilação, o qual é regulado pelas enzimas acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs). As HATs catalisam a adição do grupo acetil da molécula doadora acetil-coenzima A (acetil-CoA), aos resíduos de lisina das histonas, o que neutraliza a carga positiva das extremidades destas proteínas, enfraquecendo desta forma as interações eletrostáticas entre os nucleossomas, bem como entre as histonas e o DNA [43, 44]. Assim, a cromatina adota uma configuração mais aberta e, consequentemente torna-se acessível à maquinaria de transcrição celular [43].

A acetilação de histonas nos resíduos de lisina regula a transcrição e está associada à cromatina ativa transcripcionalmente. As HDACs antagonizam a função de HATs, reduzindo os níveis de acetilação de histonas e estão associadas a repressão da transcrição dos genes supressores de tumor. Os altos níveis de expressão de HDAC são encontrados no cancro de cólon e da mama [45].

A metilação de histona nos resíduos de lisina e arginina foi ligada a um certo número de processos celulares como o reparo do DNA, a replicação transcricional, a ativação e a repressão [34]. A metiltransferases de lisina são enzimas que catalisam adição de grupos metilo aos grupos  $\epsilon$ -amino de lisina de H3 e H4, com respostas na ativação ou repressão génica [46]. Os resíduos de lisina da cauda N-terminal de histona H3: K4, K9, K27 e K36, são alvos específicos primários de histonas metiltransferases e demetilases. A metilação de H3K27 é abundante, e existem três estádios diferentes (mono-, di-ou tri-metilação). A título exemplificativo, Peters e colaboradores demonstraram que em

células estaminais embrionárias, acontece 50% de dimetilação, 15% de monometilação e 15% de trimetilação em H3K27, respectivamente [47].

As concentrações excessivas EZH2 foram contidas como um marcador de cancro de mama agressivo [48] e associado com invasão e progressão do cancro (Figura 7). A JMJD3 (KDM6B, [*Jumonji-domain containing protein 3*]) e UTX (KDM6A [*Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on the X chromosome*]) são demetilases que atuam sobre H3K27 (figura 7B), removem o gene inativador H3K27 di-metilo e tri-metil, assim contribuindo para a manutenção da expressão do gene. Níveis aberrantes de UTX e JMJD3 têm sido associados com eventos de cancro e defeitos de diferenciação [49].



**Figura 7.** Regulação da transcrição através da metila H3K27. (A) A regulação de repressão transcrição pelo complexo repressor polycomb 2 (PRC2). Os complexos PRC2, incluem EED, SUZ12, RbAP46/48 e EZH2, catalisa a di-e tri-metilação H3K27. Esta atividade por sua vez leva a condensação e repressão de cromatina transcripcionalmente. O complexo PRC2 contendo EZH1 também pode catalisar metilação H3K27 ou condensar a cromatina através de um mecanismo diferente. G9A tem atividade metiltransferase H3K27 e também afeta o



silenciamento do gene. (B) A ativação da transcrição regulada por UTX e JMJD3. UTX e JMJD3 são demetilases que formam complexos com MLL, RbBP5 e WDR5. A remoção de grupos metilo a partir de H3K27me3 leva a cromatina transcripcionalmente ativa.

A metilação em H3K27 está relacionada ao silenciamento da expressão de genes HOX que controlam o desenvolvimento e diferenciação das células no embrião e a inativação do cromossomo X durante o “*imprinting*” genómico [34].

No estudo do cancro da mama, Elsheikh e seus colaboradores [50] analisaram uma série de acetilação da lisina H3K9ac, H3K18ac, H4K12ac e H4K16ac, a metilação da lisina H3K4me2 e H4K20me3, e a metilação de arginina (H4R3me2). Os altos níveis de acetilação e metilação das histonas globais estão associados a um bom prognóstico e foram detetados quase que exclusivamente em tumores de mama do tipo luminal (93%). No entanto, níveis moderados e baixos de acetilação da lisina H3K9ac, H3K18ac e H4K12ac, a metilação da lisina H3K4me2, H4K20me3 e da arginina (H4R3me2) foram observados em tumores malignos caracterizados como mau prognóstico, por exemplo, tumores tipo basal e tumores HER-2 positivo.

A epigenética contribui para o aparecimento do cancro devido a sua ação na repressão dos genes supressores tumorais promovida pela atividade individual ou combinada de HDACs, HMTs (histonas metiltransferases), DNMTs (DNA metiltransferases) e SWI/SNF; ativação de genes normalmente silenciados como, oncogenes, onde a atividade das enzimas HATs e HMTs estão envolvidas, e por último substituição das histonas do núcleo por variantes de histonas especialmente modificadas [51] (ver mas abaixo).

**Micro-RNAs:** Os microRNAs (miRNAs) são pequenos fragmentos de RNA não codificado que são envolvidos na regulação da expressão genica de forma pós-transcricional [52]. Os miRNAs estão envolvidos em processos biológicos cruciais, incluindo desenvolvimento diferenciação, proliferação e apoptose [37]. A expressão dos miR-335, miR-126, miR-206, miR-122, miR-199 e miR-489 estão diminuídas nas células de metástase do cancro. No entanto, a expressão de miR-126 e miR-335 diminuem metástase das células do cancro de mama [53].

A sobre-expressão microRNAs, miR-126 e miR-335, em células de cancro de pulmão diminuem a metástase em ossos *in vivo*, enquanto em modelos *in vitro* como *in vivo*, os miR-373 e miR-520, diminui a metástase e reduz a invasão de células cancerígenas [54]. A desregulação dos miRNAs tem sido associada com todos os aspetos da biologia do tumor, incluindo a progressão, invasão, metástase, aquisição de resistência a vários agentes quimioterápicos [55].

### **1.5 Tipos de histonas associados ao cancro da mama**

Em eucariotas além da modificação das histonas, desenvolveram mais ferramentas para modificar o estado epigenético da cromatina. Histonas canónicas podem ser substituídas por variantes de histonas, que possuem uma sequência de aminoácido diferente. Assim sendo, estes têm diferentes características biofísicas que alteram as propriedades dos nucleossomas. Ao contrário das histonas principais, as variantes de histonas são geralmente depositadas em nucleossomas durante a fase G1 ou G2, em vez de durante a replicação do ADN. Além disso, as variantes de histonas localizam-se em regiões específicas do cromossoma, dando origem a alterações distintas em função da cromatina [56].

Recentes estudos sugerem que as mudanças na estrutura do nucleossoma ocorrem em resposta à substituição de histonas canónicas por variantes de histonas e desempenham papel importante na remodelação de cromatina [57]. As variantes de histonas agregadas em nucleossomas alteram a estrutura do cromossomo com influência na expressão génica e função celular. Existem diversas variantes de histonas na maioria das células eucarióticas, incluindo H3 (H3.1, H3.2, H3.3 e CENP-A), H2A (H2A.Z e H2A.X), etc. A variante de histona H3.1 está enriquecida na dimetilação de H3K9me2 o que leva ao silenciamento de gene e à formação de heterocromatina. A H3.2 está associada ao silenciamento de gene [58] e a H3.3 está envolvida na regulação da expressão génica, enquanto a CENP-A é essencial para a montagem do cinetocoro e formação de centrómero.

A histona H2A detém maior número de variantes, nomeadamente, a histona H2A.Z, H2A.X, MacroH2A e H2A-BbD. Estas variantes podem ter um

único papel na regulação de várias vias de sinalização celular [59]. A variante de histona H2A.Z também é conhecida como H2A.F/Z, encontrando-se conservada na histona principal H2A, representando 10% do total da H2A nas células [60]. Assim, como outras histonas, H2A.Z podem sofrer modificações pós-traducional por sumoilação, acetilação, e ubiquitinação com diferentes resultados funcionais [61]. A sumoilação de H2A.Z tem implicação na reparação do DNA [62]; a ubiquitinação correlaciona-se com localização do cromossoma X inativo (Xi) em mamíferos [63], enquanto a acetilação N-terminal leva a desestabilização nucleossomal [64]. Foi sugerido que a acetilação H2A.Z funciona como um mecanismo chave da estabilidade dos nucleossomas, atribuindo funções repressivas para as funções de ativação e não modificadas para a forma acetilada [65]. Além disso, H2A.Z acetilada foi encontrada associada a genes ativos, mas a seu papel nestes locais ainda não foi alvo de uma compreensão total.[61].

A função biológica do H2A.Z tem sido extensivamente estudada, revelando papéis na regulação da transcrição, reparação do ADN, formação de heterocromatina segregação cromossômica e mitose. A histona H2A.Z é codificada por dois genes (H2A.Z1 e H2A.Z2), sendo que estas isoformas diferem entre si por três aminoácidos na cauda N- terminal [66].

A sobre-regulação da expressão de H2A.Z relaciona-se com o aumento da proliferação celular [67, 68], enquanto a desregulação da mesma origina o aumento da taxa de instabilidade genômica, aneuploidia, e aumenta o número de ponte entre a cromatina e as células [69]. H2A.Z, desempenha um papel essencial na ativação da transcrição de genes alvo do ER alfa que são responsáveis pela regulação da proliferação celular, desenvolvimento e diferenciação. O nível elevado de expressão de H2A.Z em células humanas está associado à progressão e disseminação do cancro da mama, e significativamente associada a metástase nos linfonodos e diminuição da sobrevivência do indivíduo com cancro de mama [68].

Estudos recentes em linhas celulares humanas de cancro da mama demonstrarem que H2A.Z funciona como um gene silenciador da via senescência dependente e p53/p21[67]. A Ativação de p21 e de proteínas p53 ocorre quando a célula encontra-se em condição de estresse grave, tais como extensos danos de

DNA ou sobre-expressão de proteínas oncogénicas [70]. A p21 inibe o ciclo celular e inativa os complexos ciclina-CDK, assegurando desta forma a progressão do ciclo celular. Em células normais da mama, H2A.Z é recrutado para o promotor de p21WAF/Cip1 pela p400/Tip60 [67].

A depleção H2A.Z não tem efeito na expressão de p21 em células de cancro da mama. Na ausência de p53 funcional, sugere-se efeitos opostos de p53 e H2A.Z na proliferação celular das células humanas. A H2A.Z no promotor do oncogene c-Myc ativa a expressão de c-Myc. A proteína c-Myc funciona como um tipo de circuito fechado de realimentação que estimula a expressão de H2A.Z pela ligação ao promotor H2A.Z [68].

A histona H2AX é uma variante da histona H2A que constitui 2-25% de histonas H2A nas células de mamíferos, dependendo do organismo e do tipo de células. Tal como a maioria das outras histonas, a histona H2AX é composta de um domínio central globular, flanqueado por caudas N-terminal e C-terminal que possuem locais para várias modificações pós-traducionais: acetilação, biotinilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação[58].

Em levedura, proteína H2A, é mais semelhante à histona H2A.X de mamíferos do que a variante canónica H2A. A variante da H2A.X desempenha um papel essencial na resposta ao dano do DNA (*dna damage response*: DDR) e na manutenção da estabilidade génica. Assim, a H2A.X tem uma função bem estabelecida na reparação da dupla quebra do DNA (*double strand breaks*: DSB) provocado pelo estresse genotóxico e monitoramento da remoção de fosforilação H2A.X. igualmente, tem sido demonstrado como ferramenta útil para detetar a conclusão da reparação do DNA [71].

A histona H2A.X difere das outras por apresentar no seu domínio C-terminal um ou mais motivos SQ (serina / glutamina). Em resposta ao dano do DNA ou a dupla quebra do mesmo, a fosforilação de H2A.X em resíduo de serina no motivo SQ, produz uma proteína fosforilada denominada de gama-H2A.X [57]. A histona  $\gamma$ -H2A.X desempenha um papel essencial no recrutamento de fatores DDR e em danos locais para o reparo de DNA [71]. Entretanto, alguns estudos consideram que  $\gamma$ -H2A.X ocorre após formação indireta de DSB causado por dano endógeno como colapso da forquilha de replicação em locais de danos do

DNA, incluindo bases oxidativa, adutos DNA, quebras de cadeias simples, *cross-linking* e reparação de tais danos [72].

Recentemente, a fosforilação de histona H2A.X em serina 139 foi encontrado a coincidir com fosforilação de serina 14 de histona H2B[73]. A variante histona H2A.X possui dois domínios distintos, sendo que o domínio C-terminal interfere na ligação de fatores de transcrição e o domínio N-terminal na remodelação de cromatina por via SW/SNF[74]. Estudos com camundongo sugerem que uma associação entre a deficiência de H2A.X é predisposição ao linfoma de células B e T, assim como aos tumores sólidos incluindo cancro de mama. O nível elevado de expressão de H2A.X pode ajudar no aumento de sensibilidade do tumor a quimioterapia e radioterapia [58].

Ultimamente, H2A.X tem originado muito interesse científico, não só por causa de sua enormidade funcional, mas também em decorrência da sua localização em regiões de citogenética altamente vulneráveis, como 11q23.3, que é conhecido por sofrer frequente alteração na maioria dos cancros humanos, incluindo cancro da mama [75, 76]. O gene H2AX não é essencial, mas sua ausência mostra aumento da instabilidade genómica e sensibilidade a agentes nocivos de DNA [77, 78]. Recentemente, o microRNA (MIR) miR-24-2 foi identificado como um regulador de expressão do gene H2AX [79].

A macroH2A (mH2A) pode mediar o silenciamento génico, inibir a atividade catalítica e serve como substrato de ligação PARP1, que é uma enzima nuclear que está envolvida na ativação de gene [74]. Estudos recentes, descrevem variante macro H2A como marcador do prognóstico de cancro, pois a perda de isoformas de mH2A.1 (mH2A1.1 e mH2A1.2) e mH2A.2 é geralmente associada com a repressão da cromatina transcripcionalmente ativa [80].

A histona H2A.Bbd (Barr body deficient) é a mais recente variante de histona H2A, descrito por Chadwick e Willard em 2001 pela primeira vez em seres humanos [81]. Estes mostraram-se excluídos do cromossomo X inativo do sexo feminino. A sua distribuição coincide com as regiões de acetilação das histonas H4 no núcleo sugerindo sua associação com regiões do genoma eucromáticos transcripcionalmente ativo [81]. Além da acentuada deficiência de H2A.BbD no cromossomo X inativo, a sua presença é reciprocamente exclusivo com

macroH2A, outra variante histona H2A que possui forma enriquecida no cromossomo X inativo. No entanto, a presença de histona H2A.BbD pode ser vista como marcador de cromatina ativa enquanto o macro H2A é um silenciador da cromatina altamente dinâmico [81].

A histona H2A tipo 2-C é o objetivo do nosso estudo e é uma variante de histona H2A. Foi descoberta usando a técnica de espectrometria de massa em células de mama de camundongo em estágio altamente indiferenciado e proliferativo. Até o momento não existe informação de sua expressão ou função publicada.

## **1.6 Vias de sinalização envolvidas na proliferação e diferenciação celular**

### **MAPKs**

As cascatas MAPKs são ativadas por diversos tipos de estímulos e têm sido associadas ao controle de processos celulares importantes, como a proliferação celular, o crescimento da célula, a apoptoses e a diferenciação [82]. As MAPKs melhor descritas são: ERK 1/2 (Extracellular signal-Related Kinases), JNK 1, 2 e 3 (Jun amino-terminal Kinases), p38-MAPK e ERK5. As MAPKs ativam-se ao serem fosforiladas em tirosina e treonina por kinases dupla específicas, pelas cinases de MAPK (MAPKK ou MEKs) em um motivo conservado TXT (treonina, X, tirosina) de seu domínio cinase [82].

A atividade das cinases de MAPKs encontra-se, por sua vez, regulada por fosforilação em serina e treonina em um motivo conservado de seu domínio kinase, pelas kinases de kinases de MAPK (MAPKKK o MEKKs), que é a camada mais externa na cascata de sinalização. A ativação destas últimas encontra-se determinada por diferentes fatores entre os quais encontram-se outras kinases e proteínas pequenas que unem GTP (sGp). As proteínas sGp da via ERK são as proteínas Ras [83] enquanto os membros da família Rho (RAC1, Cdc42, RhoA e RhoB) atuam nas vias da p38 e JNK [84].

As características de ativação em camadas são compartilhadas pelas 4 cascatas e os módulos de MAPKs mencionados referindo-se o seu nome ao componente da camada mais profunda. Enzimas específicas denominadas fosfatases, hidrolisam estas proteínas fosforiladas concluindo assim o sinal de

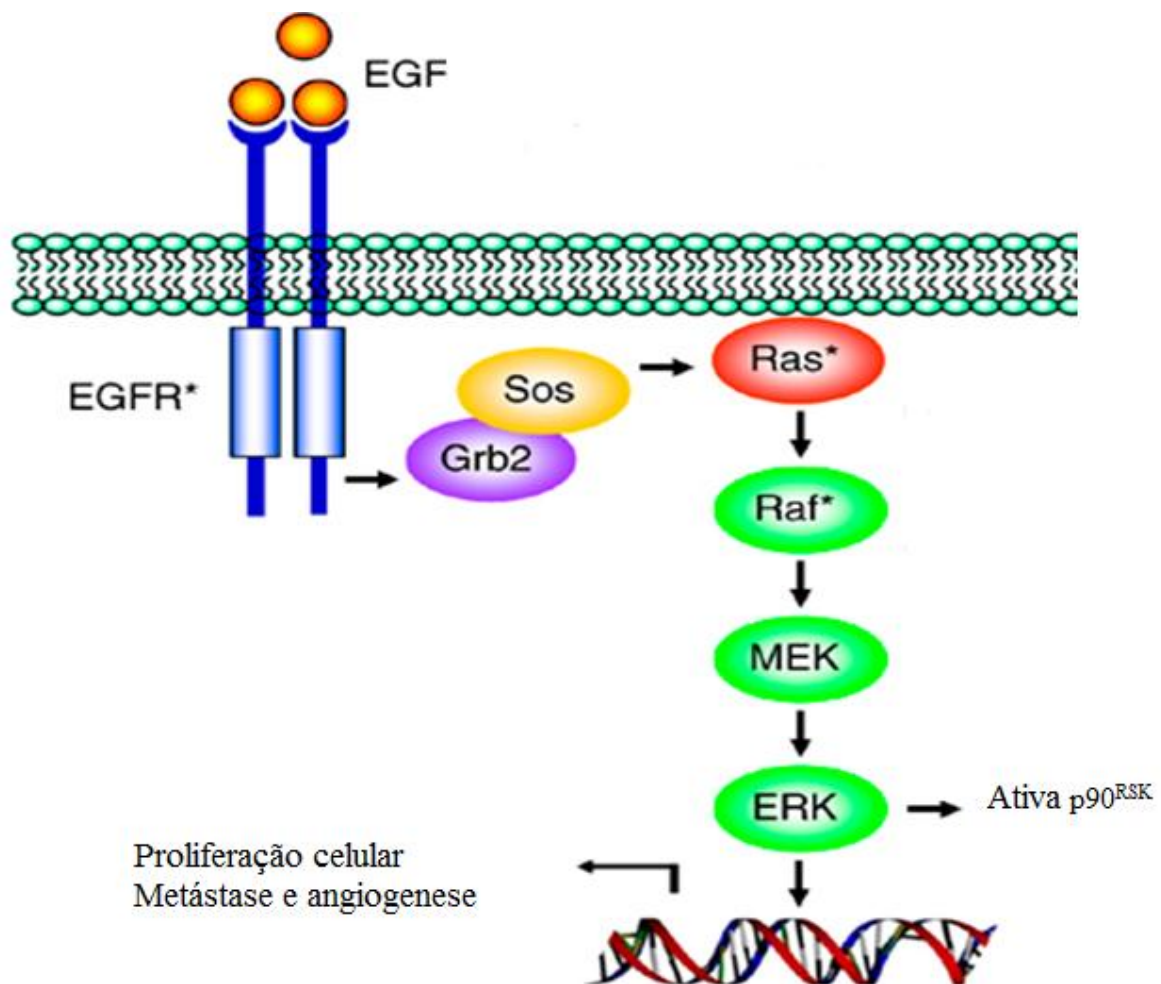
ativação das mesmas. Não obstante o fato de cada uma destas cascatas partilharem o padrão de ativação, existem estritas especificidades dentro de cada módulo de MAPKs (ERK, JNK ou p38) preservando-se um certo grau de linearidade dentro de cada via. As MAPKKs são muito seletivas, no entrecruzamento de membros de diferentes unidades MAPK. Em alguns casos MAPKKs podem distinguir entre isoformas de um módulo dado [85]. Embora a comunicação cruzada entre distintos módulos de MAPKs, esta ainda é mais visível entre distintos tipos de sinalização.

#### **1.6.1 A via MEK $\frac{1}{2}$ / ERK $\frac{1}{2}$**

A via de ERK foi identificada pela primeira vez a jusante de oncogénico Ras e é frequentemente envolvida na regulação do crescimento e diferenciação celular. Existem duas isoformas de ERK, ERK1 e 2, que são por vezes referidos como p44/p42 MAP kinases [86]. A cascata Raf/MEK/ERK é ativada pela transmissão de sinais dos recetores de superfície celular, em especial os com atividade tirosina-cinase (RTK) como os membros da família do recetor de fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor*: EGFR): EGFR (ou Her1), ErbB2 ou Her2, Her3 e Her4 e recetores ligados à proteína G. A ativação de Raf depende da ligação da proteína Ras à membrana bem como aos eventos de múltipla fosforilação [87](Figura 8).

A regulação de Ras e de Raf é essencial para a manutenção da proliferação celular que em decorrência de mutações nos mecanismos de ativação dos respetivos genes leva à oncogénese. Uma vez ativada a Raf liga-se e fosforila as kinases MEK1 e MEK2, (MEK  $\frac{1}{2}$ ) que por sua vez fosforilam ERK1 e ERK2 (ERK  $\frac{1}{2}$ ). As alterações genéticas mais frequentes detetadas no cancro são na família de oncogenes Ras, que têm papel no controle do crescimento tanto de células normais quanto tumorais [87] e no cancro da mama, hiperativação ou sobre-expressão de EGFR ou ainda mas frequentemente Her2 que leva a uma ativação constitutiva da via da ERK. A principal consequência desta ativação constitutiva parece ser a promoção do crescimento tumoral, invasão, angiogénese e metástase. Contudo, a sinalização através das ERK  $\frac{1}{2}$  pode levar ao aumento na expressão de fatores de crescimento e citocinas pelo tumor que de forma autócrina estimula seu crescimento. As ERK  $\frac{1}{2}$  atuam na progressão do ciclo

celular por induzir a expressão das ciclinas D e E, promover a fosforilação e indução da degradação do inibidor do ciclo celular (inibidor de CDK) p27<sup>kip</sup>. Outro importante papel da ERK no cancro é sua habilidade de regular a nível transcripcional e pós-transcripcional a motilidade celular, remodelação de matriz extracelular e a produção de fatores angiogénicos como o fator de crescimento de endotélio e vasos (*vascular endothelial growth factor*: VEGF). Além disso, a ativação desta via pode promover resistência a drogas anti-cancro por inativar a via pró-apoptótica das caspases e de Bad e também pela diminuição da expressão de p53, sendo que todas essas proteínas são necessárias para o processo de resposta a erros genéticos [87].



**Figura 8.** A via de sinalização da Ras-Raf-MEK-ERK. Eventos que seguem a ligação de um ligante ao recetor tirosina kinase (RTK). Proteína ligadora de receptor de fator de crescimento 2 (Grb2). Representa uma molécula adaptadora;



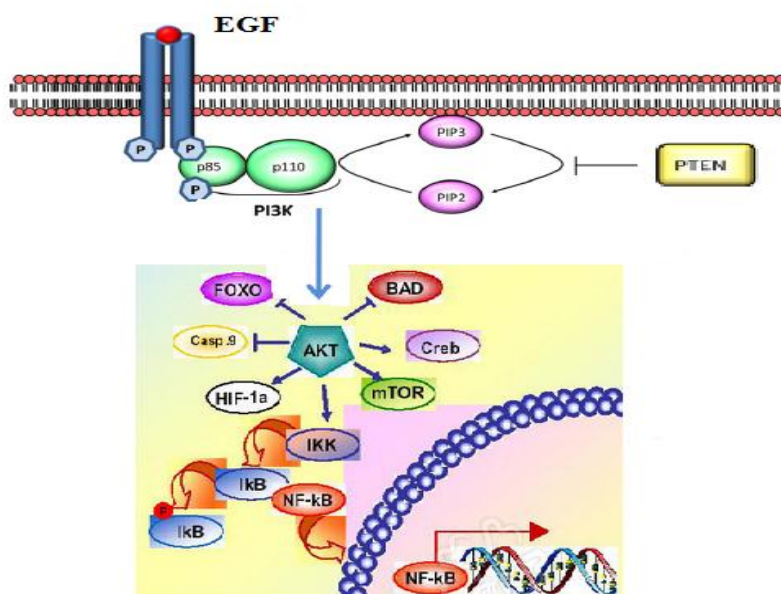
SOS um fator trocador de GTP. A ativação sequencial de Ras-Raf-MEK-ERK resulta em fosforilação tanto de fatores citoplasmáticos (p90<sup>RSK</sup>:ribosomal 6 kinase) quanto nucleares (c-myc, fos, ER, etc), levando à proliferação celular, metástase, e angiogênese. Adaptado de Brown, M.D. and D.B. Sacks [88].

### **1.6.2 A via da PI3K/AKT**

A fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K) exerce um papel fundamental no metabolismo do cancro [89], progressão do ciclo celular, diminuição de apoptose e aumento da capacidade de metástase das células cancerígenas [90]. A ativação desordenada da via da PI3K contribui na transformação celular e progressão tumoral de vários tipos de cancro incluindo os de ovários e de mama. O mecanismo de ativação pode ocorrer através de ativação Ras ou diretamente por alguns RTKs que respondem a vários fatores de crescimento e citocinas como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, fator de crescimento do tipo insulina, EGF entre outros. A ativação da via da PI3K/AKT inicia-se através do recrutamento de PI3K na membrana plasmática através da união do seu domínio SH2 a proteína tirosina fosforiladas. Contudo, os resíduos de tirosinas fosforiladas e os recetores tirosina cinase interagem com subunidade reguladora de PI3K, p85 [91].

A PI3K é um heterodímero que consiste em uma subunidade reguladora p85 e uma subunidade catalítica p110, com função de transferir o grupo fosfato e do ATP ao PIP2 (originando PIP3 e ADP). PIP<sub>3</sub> serve como elo de ligação no recrutamento da proteína cinase B ou também chamada AKT na membrana plasmática através da interação direta com domínio PH de AKT[92]. A AKT é uma proteína cinase de resíduos serina/treonina. Existem evidências que o gene supressor de tumor PTEN desfosforila PIP3 atua como regulador negativo da via PI3K [92]. Portanto, a inibição da AKT poderia ser um mecanismo de sensibilização de células tumorais por facilitar a ativação da maquinaria apoptótica, sendo um possível alvo na terapia contra o cancro [92]. Akt fosforila as proteínas apoptóticas Bad e caspase 9, inibindo suas capacidades apoptóticas e promovendo sobrevivência celular[92]. Akt ativa fator de transcrição NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  e CREB, que tem como consequência um aumento na transcrição de genes anti-apoptóticos (Figura 9).

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B medeia a resposta imune, inflamatória e sobrevivência celular [93]. NF- $\kappa$ B também é ativado por Akt através da fosforilação da cinase inibidora cinase *IKK $\alpha$* . Após a sua ativação, IKK fosforila I $\kappa$ B, marcando-o para ubiquitinação e degradação no proteossoma. Este expõe os lugares de localização nuclear de NF- $\kappa$ B e o permite a translocação aonde induz a expressão de genes anti-apoptóticos [92, 94]. Os fatores de crescimento como EGF ativam NF- $\kappa$ B com o intuito de proteger as células contra a apoptoses, pelo contrário, a inibição de NF- $\kappa$ B sensibilizam a célula a uma ampla variedade de estímulos pro-apoptóticos (Figura 9).



**Figura 9.** Modelo da via da PI3K/AKT. A ativação de Akt controla a sobrevivência celular através da fosforilação de alvos que dependem dele, com o resultado do aumento da sobrevivência celular a proliferação, crescimento e metabolismo. Adaptado de <http://www.biocancer.com>.

### 1.6.3 A via da P38-MAPK

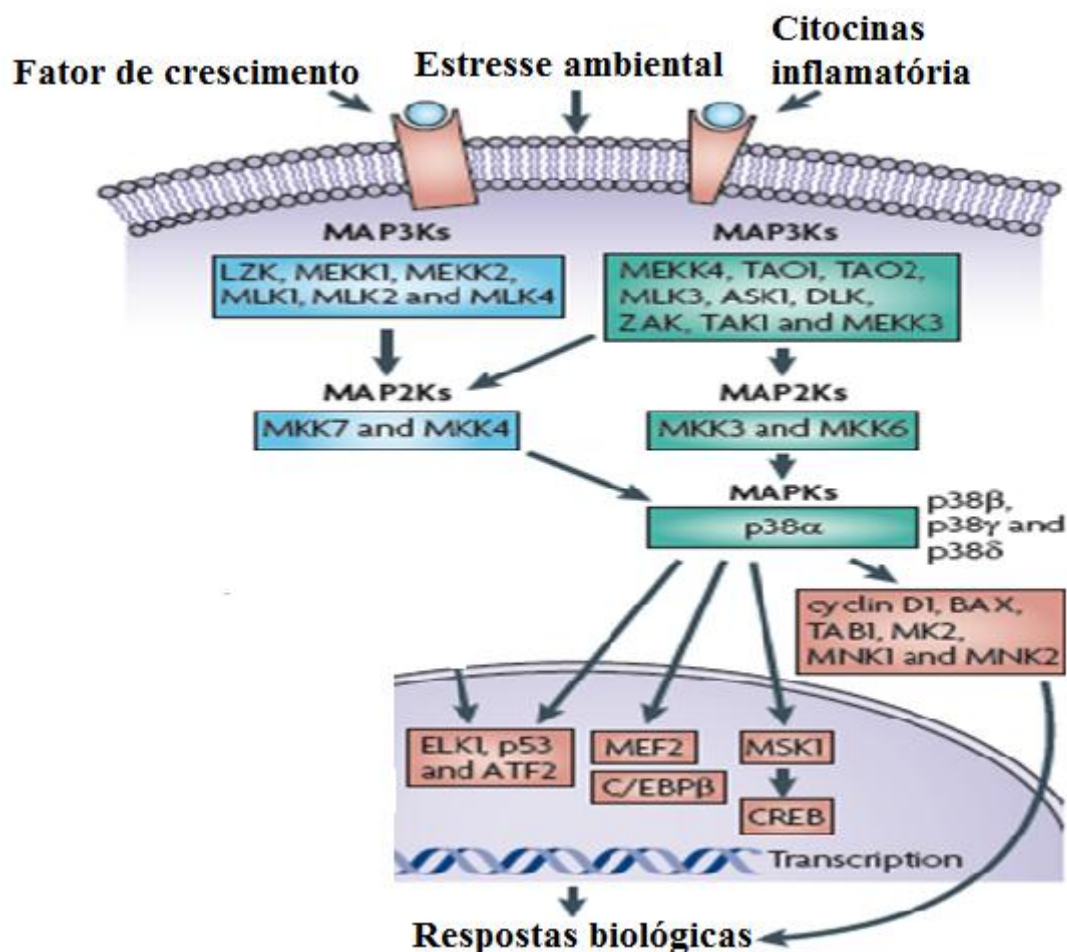
A via de p38-MAPK, que também é chamada via de proteína kinase de estresse-ativado, frequentemente desregulado em cânceros. p38-MAPKs, é ativada por estresses ambientais e genotóxicos e tem papel fundamental tanto na

inflamação quanto na hemóstase dos tecidos, visto que é responsável pelo controle da proliferação, diferenciação, sobrevivência e a migração de tipos células específico [95]. As suas funções no desenvolvimento do cancro são complexas, a qual é consistente com a grande variedade de respostas celulares que eles modulam. Algumas células (não cancerígenas) utilizam estas vias de sinalização como forma de antagonizar a proliferação celular e transformação morfológica, enquanto as células cancerígenas podem desordenar estas vias para facilitar a sobrevivência, proliferação e invasão.

As isoformas de p38 funcionam tanto como supressores de tumor quanto oncoproteínas em tipos específicos de células. Existem quatro genes que codificam p38 MAPKs: MAPK14 (que codifica p38 $\alpha$ ), MAPK11 (que codifica p38 $\beta$ ), MAPK12 (que codifica p38 $\gamma$ ) e MAPK13 (que codifica p38 $\delta$ ); além das mencionadas, duas isoformas de splicing alternativo de MAPK14 também têm sido relatadas [96]. As p38 $\alpha$  e p38 $\beta$  são proteínas estritamente relacionadas que podem ter funções sobrepostas. A p38 $\alpha$  é altamente abundante na maior parte dos tipos de células, enquanto a p38 $\beta$  parece ser expresso em níveis muito baixos, sendo que a sua contribuição para a sinalização não é clara. Igualmente, as referidas proteínas, p38 $\gamma$  e p38 $\delta$ , têm padrões de expressão mais restritas e tendem a ter funções especializadas. As p38 $\alpha$  são ativadas por MKK3 e MKK6 kinases, e, por vezes, por MKK4 (Figura 10). A auto-fosforilação pode também contribuir para a ativação de p38-MAPK [97, 98].

Os dois grandes grupos de proteínas que são reguladas pela fosforilação da p38-MAPK mediada são fatores de transcrição, tais como p53, ATF2 (*activating transcription factor 2*), EIK1, ATF2, MEF2 *myocyte-specific enhancer factor 2*) e C / EBP $\beta$ , e kinases de proteína, incluindo MK2 (MAPK- *activated 2*), também conhecido como MAPK2, e MSK1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase 1*), MNK1 (MAP *kinase-interacting serine/threonine kinase 1*) e MNK2 [97] (Figura 10). Há muitas evidências que conferem plausibilidade à certeza no papel da p38 $\alpha$  como supressora de tumor. A referida função é mediada principalmente por regulação negativa da progressão do ciclo celular e pela indução de apoptose, não obstante o fato da indução de diferenciação terminal também contribuir com a

mesma função [99, 100]. Entretanto, p38 $\alpha$  também pode ter funções oncogênicas que são mediados através da sua participação nos processos-chave da progressão de cancro, tais como a inflamação, invasão e angiogénese [100].



**Figura 10.** A ativação da via p38-MAPK por fator de crescimento, estresse ambiental e citocinas inflamatórias, os quais determinam a resposta biológicas incluindo de proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e migração para a inflamação e cancro. Adaptado de Wagner, 2009 [101].

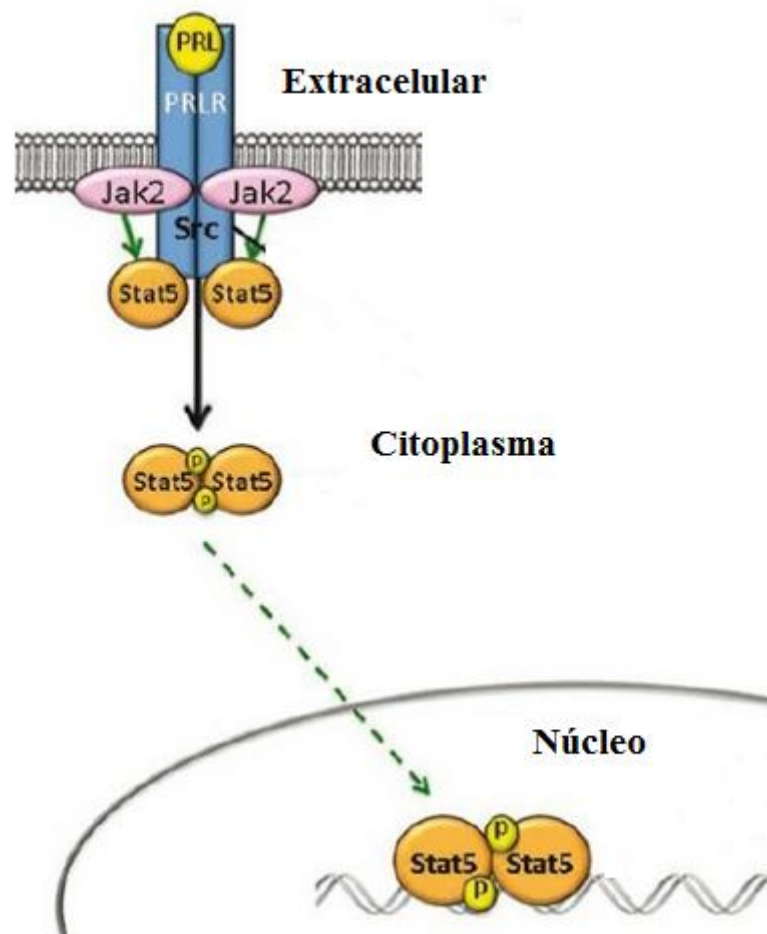
#### 1.6.4 A via JAK2/STAT

O JAKs (Janus kinase) e Stat( transdutor de sinal e ativador de transcrição) constituem a via (Jak / Stat) [102]. As JAKs são tirosinas kinases que estão pré-associadas com regiões próximas da membrana dos recetores de citocinas. A de recetores na membrana resulta na oligomerização das subunidades do recetor,

que induz a aproximação das JAKs. Estas tornam-se ativadas por fosforilação em tirosina e iniciam a cascata de sinalização através da fosforilação em resíduos de tirosina presentes em domínios citoplasmáticos do recetor e em proteínas associadas ao recetor [103].

Esses domínios ancoram os STATs (*Signal Transducers and ativator of Transcription*), que são proteínas latentes no citoplasma, e após estímulo são recrutados através da interação entre os domínios SH2 (*Src homology 2*) e sequências específicas fosfotirosinas do recetor. Uma vez recrutados, os STATs se fosforilam, dissociam-se do recetor e dimerizam-se através da interação com os recíprocos domínios SH2 [104]. Por fim, adquirem uma atividade de ligação ao DNA, que induz a exposição da sinal de localização nuclear (*nuclear localization signal*) e a migração para o núcleo, onde regulam a transcrição de genes específicos. Em mamíferos há sete tipos de STATs descritos: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 e STAT6. O STAT5 foi originalmente identificado em glândula mamária de camundongos lactantes como mediador da atividade do promotor do gene da beta caseína. Existem duas isoformas caracterizadas de STA5, denominadas STAT5a e STAT5b. Segundo Lui e colaboradores estas isoformas exercem função essencial na ação biológica da prolactina [103, 104].

A prolactina (PRL) utiliza um recetor de membrana ativada por membros da família das citocinas que traduz o sinal para a JAK2 e ativa o fator de transcrição STAT5 (Figura 11) para regular a expressão de genes de proteínas do leite como a beta caseína. Ainda, o recetor de glucocorticoides (glucocorticoid receptor: GR) que é um fator de transcrição ativado pela união ao ligando, tem efeito sinérgico sob a ativação da transcrição do gene de  $\beta$ -caseína [105]. A transcrição da beta caseína é o marcador de diferenciação terminal e funcional da glândula mamária ativada pela ação de proloctina e glucocorticóides durante a lactação [106]



**Figura 11.** A via de sinalização JAK2/STAT5. A ligação da PRL ao recetor, induz a dimerização e fosforilação de Jak2 que recruta, ancora e fosforila STAT5, permitindo a sua dimerização, migração e translocação para o núcleo, onde se ligam sequencias do DNA promovendo a transcrição de genes específicos. Adaptado de Wagner, K.-U. and J.W. Schmidt [107]

### 1.7 Modelo de estudo

Células HC11: foram obtidas a partir de tecidos da glândula mamária de camundongo *BALB/c* em meados da prenhez [108]. As células HC11 são um excelente modelo para estudar a diferenciação de células epiteliais mamárias. Estas células não são tumorigênicas, tem p53 mutado e retêm as características das células mamárias progenitoras ou tipo estaminais (*Stem Cell-Like*: SC-L). Nestas células a ativação do EGFR é essencial para manter o estado indiferenciado das mesmas, mantendo-as em fase de proliferação (SC-L). Em

células HC11, a ativação do EGFR também confere a competência às células para logo responder às hormonas lactogénica [109]. Após a remoção de EGF, as células cultivam-se durante 48hs em meio com pouco soro para as tornar competentes ou pré-diferenciadas (PD). Estimulação das células HC11 pelas ações sinérgicas de insulina hormonas lactogénicas prolactina (Prol) e dexametasona (Dex) *in vitro* [110], ativa a diferenciação funcional (DIF) e estas células começam por sintetizar a proteína do leite  $\beta$ -caseína. [111].

Células MDA-MB-231: são células de cancro da mama humano. Estas células representam o cancro de tipo basal / triplo negativo que é o mais agressivo de todos os tipos de cancro da mama e estas células expressam EGFR. Estudos recentes identificarem muitas similaridades entre as células progenitoras/estaminais da mama humanas, células HC11 no estágio SC-L e as células de cancro de tipo basal, corroborando assim a hipótese que o cancro da mama poderia originar-se em alterações nas células progenitoras/estaminas mamarias [112] .

## **2 Objetivos**

O presente estudo teve como objetivo geral o estudo da expressão da histona H2A tipo 2-C na diferenciação celular e em células de cancro da mama. Para este fim, privilegiou-se o uso das linhagens de células HC11 nos diferentes estádios de diferenciação (SC-L, PD e DIF) e células do cancro da mama tipo basal MDA-MB-231 utilizando duas técnicas complementares: Western Blot e Imunocitoquímica.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar a expressão da histona H2A tipo 2-C na diferenciação das células epiteliais mamárias HC11.
- Estudar a expressão da histona H2A tipo 2-C em células do cancro da mama com alta agressividade.
- Verificar o papel das vias MEK $\frac{1}{2}$  / ERK $\frac{1}{2}$ , PI3K / AKT e p38-MAPK na regulação da expressão da histona H2A tipo-2C.



### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Cultura de células

As células mamárias epiteliais HC11 foram cultivadas em meio RPMI 1640, com 10% soro fetal bovino (FBS), L-glutamina, 5µg/mL de insulina, 10 ng/mL de EGF e 50 µg/mL de gentamicina. Com estas condições obteve-se o estado SC-L. Para se obter as células no estado PD, após atingir 100% confluência meio de cultura foi mudado para meio sem EGF e com 2% FBS por um período de 48 horas. Para obter o estágio DIF, mudou-se novamente o meio de cultura para meio sem EGF, com 2% FBS; e adicionou-se 100nM de dexametasona e 1µg/mL de prolactina e as células foram cultivadas por 72 horas. A linha celular MDA-MB-231 foi cultivada em meio Leibowitz com 10% FBS e 50 µg/mL de gentamicina. O cultivo das células realizou-se a 37°C em uma atmosfera húmida com 5%CO<sub>2</sub> no ar. Além das mencionadas estratégias, as células HC11 em estado SC-L ou MDA-MB-231 com 10 ng/mL EGF foram também cultivadas com 1 µM UO126 (inibidor de MEK<sup>1/2</sup>), 3 µM LY294002 (inibidor de PI3K) e 5 µM SB20580 (inibidor de p38 kinase) por 24h. Todos os reagentes para cultura celular foram de PAA (Austria).

#### 3.2 Extração de proteínas totais

O procedimento conducente à extração de proteínas totais consistiu em lavagens das células aderentes com PBS (1.37 mM NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), sendo que estas foram recolhidas com um raspador e transferidas a um tubo plástico de 1.5 mL e centrifugadas durante 2 minutos, 14000 rpm. O *pellet* celular foi ressuspenso com 2 a 3 vezes (m/v) tampão Wu (400mMNaCl, 10Mmhepes, pH7.4; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1mM EDTA; 5% Glicerol) com inibidor de protease, inibidores de fosfatase II e III e DTT (1mM DTT), tendo permanecido em gelo durante 20 minutos. Em seguida, procedeu-se à centrifugação à 14000 rpm por um período de 10 minutos a 4°C. Finalmente, foi feita alíquota do sobrenadante e o armazenamento foi feito à uma temperatura de 70°C. Todos os reagentes foram de Sigma (USA).

### 3.3 Extração proteína da fração nuclear

O processo consistiu na lavagem das células com PBS, sendo que a recolha das mesmas foi feita com recurso ao raspador para tubos de plástico de 1.5 mL e a centrifugação a 1000 rpm por um período de 5 minutos a temperatura de 4°C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, foi repetida a lavagem com PBS, e a centrifugação teve lugar nas mesmas condições anteriores. Na sequência, descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi ressuspensionado com 1ml de tampão RSB (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl e 6mM MgCl<sub>2</sub>), com inibidor de protease, cocktail de inibidor de fosfatase (II e III) e 1 mM DTT. Colocou-se a suspensão de células num recipiente de vidro Dounce previamente em gelo, foram feitos 30 ciclos com força mecânica sempre em gelo e a mesma foi colocada num tubo 1.5 mL.

As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, adicionou-se ao *pellet* o tampão C (20%Glicerol; 200mM HEPES pH7.9; 420mM NaCl; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2mM EDTA) com inibidor de protease, cocktail de inibidor de fosfatase (II e III) e 1mM DTT. Deixou-se 20 minutos em gelo, pois este procedimento facilita a saída das proteínas, mas não do DNA. Por último, centrifugou-se o precipitado a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C e foi feita alíquota do sobrenadante e armazenou-se à -70°C. Todos os reagentes foram de Sigma (USA)

### 3.4 Quantificação proteica

Após a extração de proteínas, realizou-se a quantificação proteica com recurso ao método BCA (BioRad, USA). Para a realização da análise foram utilizadas 5µl de amostra em duplicado. Relativamente à reta padrão preparou-se 6 diluições utilizando o padrão de albumina de soro bovino (BSA, Sigma). Os dois reagentes utilizados A (A` + S) e B foram aplicados nas amostras de proteínas e da reta a serem estudadas. Posteriormente incubou-se a 37°C durante 15 minutos, seguida da medida da absorvência das amostras a 750nm. A reta padrão das amostras foi utilizada como referência para determinar a concentração proteica das amostras desconhecidas.

### 3.5 Western blotting

Aproximadamente 20-50 µg de proteínas de cada amostra foram reduzidos com tampão de Laemmli (0.2 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.003 de azul de bromofenol, 2% mM β-mercaptoetanol, 6% SDS, 30% glicerol), aquecido pelo calor por 5 minutos a 100°C para completar o processo de desnaturização. Posteriormente procedeu-se à separação electroforética das proteínas em géis desnaturizantes de poliacrilamida /SDS (SDS-PAGE). A composição dos géis separadores utilizada foi: acrilamida:bisacrilamida (40:2) % variável (7.5, 10 e 14%), 0.1 mM de Tris-HCl 1.5M pH=8.8, 0.2% de SDS, 0.1% APS e TEMED 0.01%.

A separação obedeceu ao peso molecular das proteínas a estudar e a composição dos géis concentradores utilizada foi 4% acrilamida: bisacrilamida (40:2), 0.2M de Tris-HCl 0.5M pH=6.8, 0.1% de SDS, 0.05% APS e TEMED 0.01%. As amostras foram corridas a tensão constante (cerca 90 minutos a 200V) no tampão correspondente (0.25M Tris-base, pH=8.6; 1.92M glicina e 1% SDS). Como marcador de peso molecular foi utilizado Precision Plus Protein Dual Xtra Standards #161-0377 (Bio-Rad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de decafluoreto de polivinil (PVDF; Millipore, USA) em sistema submerso contendo tampão de transferência (0,25M Tris-base, pH=8.6; 1.92M Glicina; 20% metanol; 1% SDS) por 2 horas a 200 mA.

Após a eletrotransferência realizou-se coloração das proteínas na membrana durante cerca de 5 minutos com uma solução roxa Ponceau S [(TetrasodiumTetrasodium3-hydroxy-4-(2-sulphonato-4 (4sulphonatophenylazo)phenylazo)naphthalene-2,7-disulphonate) com o propósito de verificar a eficiência de transferência. Para a imunodeteção, a membrana foi bloqueada à temperatura ambiente durante 1 hora com uma solução 5% leite magro diluído em TBS (1M tris-HCl, pH 7.5; 5M NaCl) 0.05% Tween-20 sob agitação. Todos os processos de incubação e lavagem foram em agitação. Posteriormente, a membrana foi incubada por cerca de 2-3 horas a temperatura ambiente com anticorpos primários específicos correspondentes para cada caso (Tabela 3). Os referidos anticorpos foram preparados em BSA ou 5% leite magro diluído em TBS-T. Em seguida realizou-se 3 lavagens de 10 minutos cada e logo incubou-se a membrana durante 1 hora a temperatura ambiente os respetivos anticorpos secundário (Tabela 4) preparados em TBS-T. O passo seguinte consistiu na repetição do protocolo de lavagem com exceção da última lavagem que foi com TBS e por último a membrana foi revelado por quimioluminescência com o sistema ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences, UK). O sinal de

quimioluminescência foi capturado utilizando um filme de radiografia Kodak. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria utilizando o programa Quantity One (BioRad). Exeto os reagentes indicados, os reagentes foram de Sigma (USA)

**Tabela 3.** Anticorpos primários utilizados para ensaios de Western Blot.

<b>Anticorpo 1º</b>	<b>Espécie</b>	<b>Empresa</b>	<b>Nºde catálogo</b>	<b>Diluição</b>
<b>Anti-histona H2A tipo 2-C</b>	Coelho	Sigma	AV51480	1:200
<b>Anti-tubulina</b>	Coelho	Cell Signalling	09/2008	1:2000
<b>Anti-ERK1/2 total</b>	Rato doméstico	BD Biosciences	61123	1:500
<b>Anti-p-ERK1/2</b>	Coelho	Santa Cruz	16982	1:300
<b>Anti-STAT5</b>	Coelho	Santa Cruz	C-200417	1:1000
<b>Anti- p-AkT</b>	Rato doméstico	BD Biosciences	610860	1:5000
<b>Anti-AkT total</b>	Rato doméstico	BD Biosciences	610860	1:5000

**Tabela 4.** O anticorpo secundários utilizados para os ensaios de Western Blot.

<b>Anticorpo 2º</b>	<b>Espécie</b>	<b>Empresa</b>	<b>Nºde catálogo</b>	<b>Diluição</b>
<b>Anti IgG de Coelho</b>	Ovelha	Sigma	I5006	1:5000
<b>Anti- IgG de Camundongo</b>	Ovelha	Sigma	I5381	1:5000

### 3.6 Imunocitoquímica

As amostras foram fixadas em formaldeído 10% e lavadas com PBS por duas vezes. Igualmente foram incubadas com PBS + 0.5% Triton, durante 30 minutos, seguida de 3 lavagens em PBS durante 2 minutos cada. Na sequência,

procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena na célula com peróxido de hidrogénio (0.5% $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 30 minutos com o intuito de evitar falso positivo. Posteriormente as células foram novamente lavadas com PBS 3 vezes durante 2 minutos cada, bloqueou-se com 10% de soro de cavalo em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida incubou-se com anticorpo primário anti- histona H2A tipo 2-C (1/50 em PBS) durante 18 horas à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (KIT ABC – Dako Cytomation) por 30 min, foram feitas 3 lavadas em PBS durante 2 minutos cada e incubou-se com o segundo reagente do mesmo kit (estreptoavidina-peroxidase) por mais 30 min. A estreptoavidina se liga fortemente as moléculas de biotina associadas ao anticorpo secundário. Após isso, foram feitas 3 lavagens em PBS durante 2 minutos cada e as lâminas reveladas com diaminobenzidina (DAB) líquido (DakoCytomation) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1%) baixo o microscópio. Todas as lâminas foram reveladas durante o mesmo tempo.

A DAB é um substrato cromógeno que quando oxidado pela peroxidase associada a estreptoavidina atribui cor castanha à substância. As lâminas foram contra coradas com verde de metilo (corante de exclusão que cora o DNA verde), lavadas em água corrente, secadas durante 24 horas e montadas com lamínula e a solução orgânica (DPX, Fluka, USA). Os núcleos que expressam Histona H2A tipo 2-C adquirem coloração marron (positivos), enquanto núcleos com coloração verdes não expressam a histona (negativas).

### **3.7 Imunohistoquímica**

Os cortes de tecidos foram desparafinados com 3 lavagens em xileno de 5 minutos cada e seguidamente realizaram-se incubações sucessivas de 5 minutos cada em gradiente decrescente de concentração de etanol (100% x 2, 95%, 70%, 50%, e 2 x  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) com o objetivo de reidratar as amostra. Posteriormente colocou-se as lâminas com amostra dentro de uma vasilha de vidro com 1000mL de tampão citrato, pH 6.4 no micro-ondas na potência máxima durante 30 minutos. Em seguida, retirou-se deixando-as arrefecer durante 15 minutos seguida da incubação com  $\text{dH}_2\text{O}$  (água destilada) por 5 minutos e depois em PBS por 5 minutos.

Para a permeabilização, foram incubadas com PBS + 0.5% Triton, durante 30 minutos e em seguida foram feitas 3 lavagens em PBS durante 5 minutos. Após a recuperação antigénica e permeabilização procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em metanol, durante 30 minutos. Posteriormente, foi colocado no banho torneira por 5 minutos. Em seguida, bloqueio com 10% de soro de cavalo durante 30 minutos à temperatura ambiente, incubou-se com anticorpo anti-histona H2A tipo 2-C (1/50 em PBS) por cerca de 18 horas a 4°C. Após 3 lavagens em PBS durante 2 minutos, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho-biotina por 30 min, 3 lavagens em PBS e posteriormente incubadas com o segundo reagente do KIT ABC – (estreptoavidina-Peroxidase) durante 30 min. Após isso, foi revelada com DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1%) baixo o microscópio. Todas as lâminas foram reveladas durante o mesmo tempo.

As lâminas foram contra coradas em verde de metilo e montadas com lamínula e a solução orgânica (DPX). Os núcleos que expressam histona H2A tipo 2-C adquirem coloração marron (positivos), enquanto núcleos com coloração verdes são negativos.

### **3.8 Análise de dados**

Os dados de expressão de histona foram analisados por intermédio do programa *GraphPad Prism* 5. Para a semi-quantificação de células positivas por imunocitoquímica foram contadas 10 campos para cada condição de tratamentos com duas repetições. O critério utilizado para contagem de expressão de histona baseou-se em núcleos com coloração castanho como marcação positiva e núcleos com coloração verde como marcação negativa.

A análise da expressão por Western Blot foi realizada sob análise da intensidade das bandas correspondentes e normalização pela intensidade de tubulina. A análise estatística foi com recurso ao *one-way* ANOVA e Dunnett's post-test (tratamento vs controlo). Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0.05$ .

## 4 Resultados

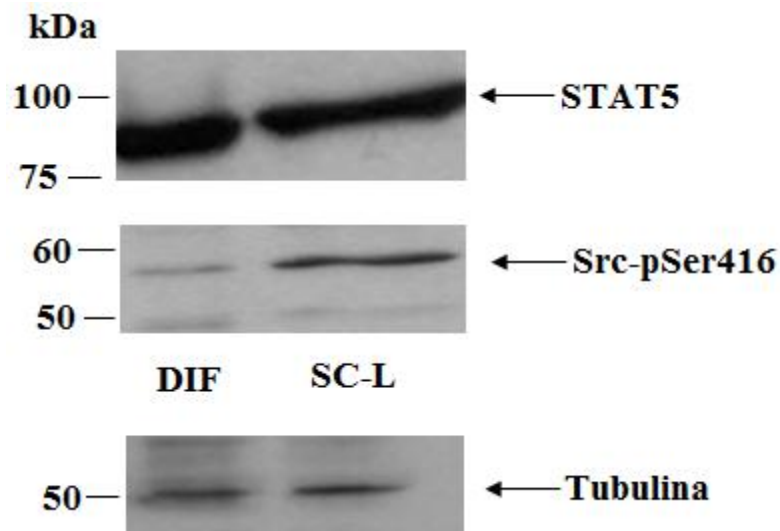
O objetivo deste estudo consistiu na análise da expressão da histona H2A tipo 2-C por Western Blot e imunohistoquímica em células epiteliais mamárias HC11. Para a prossecução dos objetivos, o programa de diferenciação das células HC11 foi dividido em três estádios experimentais: 1) Indiferenciado ou “*Stem cells like*” (SC-L) em que as células são cultivadas com EGF e portanto são induzidas para proliferar; 2) Pré – diferenciação (PD) quando o EGF é eliminado do meio de cultura, sendo que as células deixam de proliferar para iniciar o processo de diferenciação; 3) Diferenciação funcional (DIF), as em que as células são cultivadas com dexametasona e Prolactina para induzir a expressão da proteína  $\beta$ -caseína do leite. Após esta breve introdução ao capítulo, os tópicos seguintes serão dedicados à apresentação dos resultados encontrados ao longo deste estudo.

### 4.1 Confirmação do modelo experimental usado para estudo de diferenciação

O STAT5 tem papel na função mamária normal, incluindo diferenciação funcional [113]. Em particular, a expressão e fosforilação (ativação) de STAT5 é necessária para a expressão de beta - caseína e a sua expressão aumenta em células epiteliais mamarias diferenciadas, inclusive células HC11 [114].

Em primeiro lugar, visando mostrar a funcionalidade do modelo experimental de diferenciação, propôs-se então, determinar a expressão de STAT5 e de um marcador de proliferação Src (proto-oncogene c-Src) fosforilada em serina 416 (Src-pSer416) nas células HC11 cultivadas em estágio SC-L e DIF, com imunoblot (Figura 12).

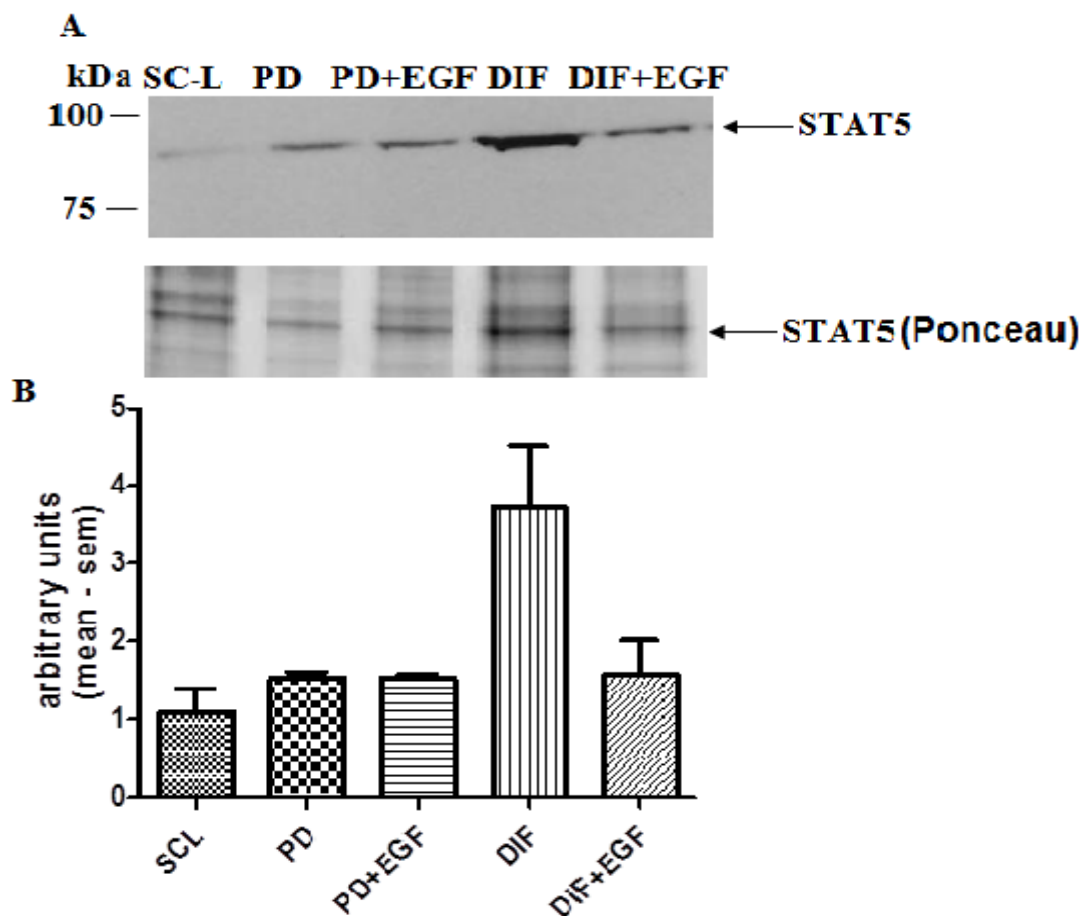
Os resultados obtidos mostraram que a expressão de STAT5 é mais elevada na fase DIF comparativamente ao SC-L. No entanto, observou-se igualmente que o Src-pSer416 tem nível de expressão mais elevado no estágio SC-L comparativamente ao estágio DIF (Figura 12).



**Figura 12.** Análise da expressão de STAT5 e Src-pSer416 nas células HC11 no estágio SC-L e DIF. As células HC11 foram induzidas a diferenciar como indicado em materiais e métodos. Utilizou-se 50µg extrato total e separou-se em SDS-PAGE de 7.5%. As membranas foram incubadas com anticorpos anti-STAT5 e Src fosforilada em serina 416 (Src-pSer416) durante 2h. Usou-se a tubulina para confirmar igual quantidade de proteína em cada línea.

Para corroborar a ativação e translocação de STAT5 ao núcleo, foi utilizado o extrato nuclear de células HC11 (Figura 13). Os resultados mostraram nível elevado de STAT5 nuclear no estágio PD e muito mais elevado no DIF. Também observou-se que a estimulação de células nos estádios PD com EGF não diminuiu os níveis de STAT5, enquanto no estágio DIF a adição de EGF consegue reverter o efeito das hormonas da lactação. Chegou-se a conclusão que com as condições de cultura adotadas, o modelo experimental responde de acordo com o esperado e as células HC11 atingem a diferenciação funcional. Também, confirmou-se que no sentido da diferenciação funcional, uma vez as células entram no programa de diferenciação (PD), este processo não é reversível, mais sim é possível inibir a ativação do STAT5 induzida no estágio DIF pelas hormonas lactogénicas.



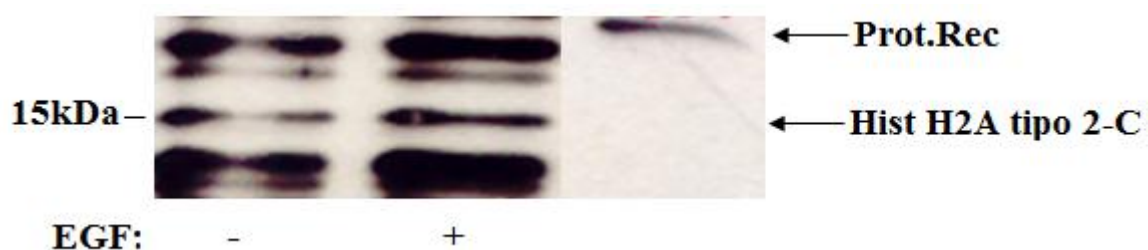


**Figura 13.** Análise da ativação de STAT5 em células HC11 em estágio SC-L, PD e DIF. (A) Experimento representativo da expressão de STAT5 com extrato nuclear de células HC11. A intensidade da banda foi corrigida usando a quantidade total de proteínas nucleares (ponceau). Os resultados foram também normalizados a quantidade em estágio SC-L. O gráfico mostra a média e sem (n=2). O tratamento com EGF correu 24h após indução de estádios PD ou DIF. Intensidade de STAT5 nuclear no estágio DIF foi mais alta do que os outros estádios.

#### 4.2 Análise da expressão da histona H2A tipo 2-C na proliferação e diferenciação de células epiteliais de mama HC11.

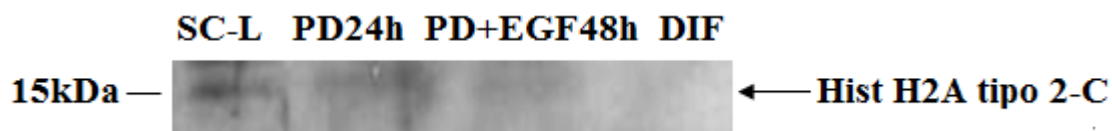
A expressão de histona H2A tipo 2-C foi avaliada por Western Blot com anticorpo específico. Como este anticorpo não tinha sido utilizado previamente, considerou-se conveniente verificar a especificidade do mesmo. Assim, utilizou-se a histona

H2A tipo 2-C recombinante como controlo positivo e procedeu-se à análise de extratos totais de células HC11 no estágio SC-L e PD. Os resultados obtidos (Figura 14) mostraram que o anticorpo deteta histona H2A tipo 2-C e os níveis mais elevados de expressão foram nas células SC-L (+ EGF) comparativamente as PD (- EGF). Também detetaram-se outras bandas. Em síntese, pode se concluir que o anticorpo deteta a histona H2A tipo 2-C, bem como as bandas inespecíficas.



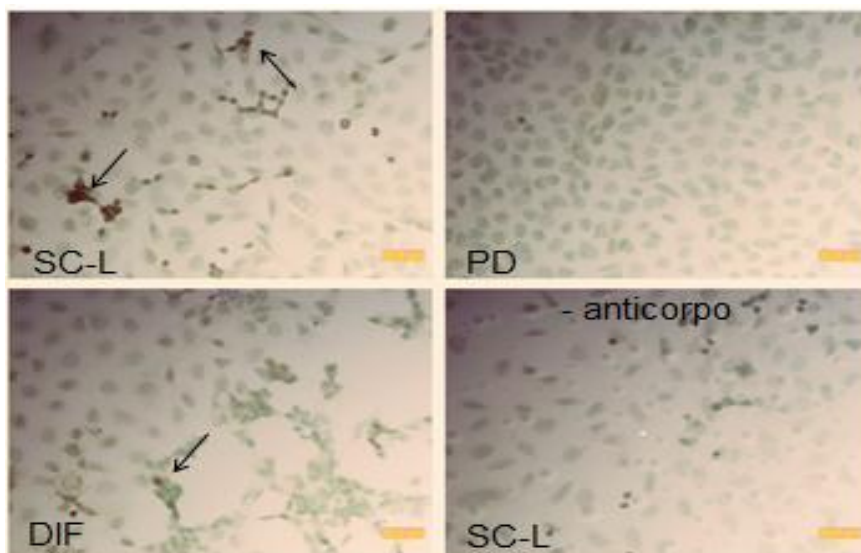
**Figura 14.** Especificidade da anti-histona H2 tipo 2-C na deteção na deteção por Western Blot. As células HC11 analisadas foram SC-L (+EGF) e PD (-EGF), utilizou-se 50µg extrato celular, separado em SDS-PAGE de 15%. Prot. Rec = histona H2A tipo 2-C recombinante pura.

Para analisar a expressão de histona H2A tipo 2-C na diferenciação das células HC11, e com o fim de diminuir o número de bandas inespecíficas, privilegiou-se a utilização do extrato nuclear dos três estádios diferentes: SC-L, PD e DIF. Como esperado, observou-se a presença de expressão no estágio SC-L (de proliferação; +EGF) e ausência de expressão em PD e DIF (Figura 15). A conclusão vai no sentido de afirmar que a histona H2A tipo 2-C é expressa no estágio SC-L, provavelmente em resposta ao estímulo com EGF. De maneira similar ao que é passível de observação na figura 13, quando as células entram no processo de diferenciação (PD) o EGF não consegue reverter a inibição da expressão de histona H2A tipo 2-C.



**Figura 15.** Expressão de histona H2A tipo 2-C em células HC11. As amostras analisadas foram cultivadas em estádios distintos: SC-L, PD, PD-48h + posterior adição de EGF por 24h e DIF. Utilizou-se 50µg de extratos nucleares e separado em SDS-PAGE 15%.

No sentido de confirmar a expressão de H2A tipo 2-C em células HC11, repetiu-se o estudo das células cultivadas nos estádios SC-L, PD e DIF, sendo que a técnica utilizada para tal, foi a imunocitoquímica. O estágio SC-L demonstra marcação positiva (Figura 16, seta), e SC-L sem anticorpo anti-H2A tipo 2-C apresentam apenas a células negativas. Nos estádios PD e DIF apresenta marcação positiva pouco significativa. Os resultados obtidos (figura 16) indicam níveis elevados de expressão de histona H2A tipo 2-C no estágio indiferenciado (SC-L) e diminuição de expressão no estágio PD e DIF. Esses resultados sugerem que a histona H2A tipo 2-C é expressa apenas no estágio de proliferação estimulada com EGF.

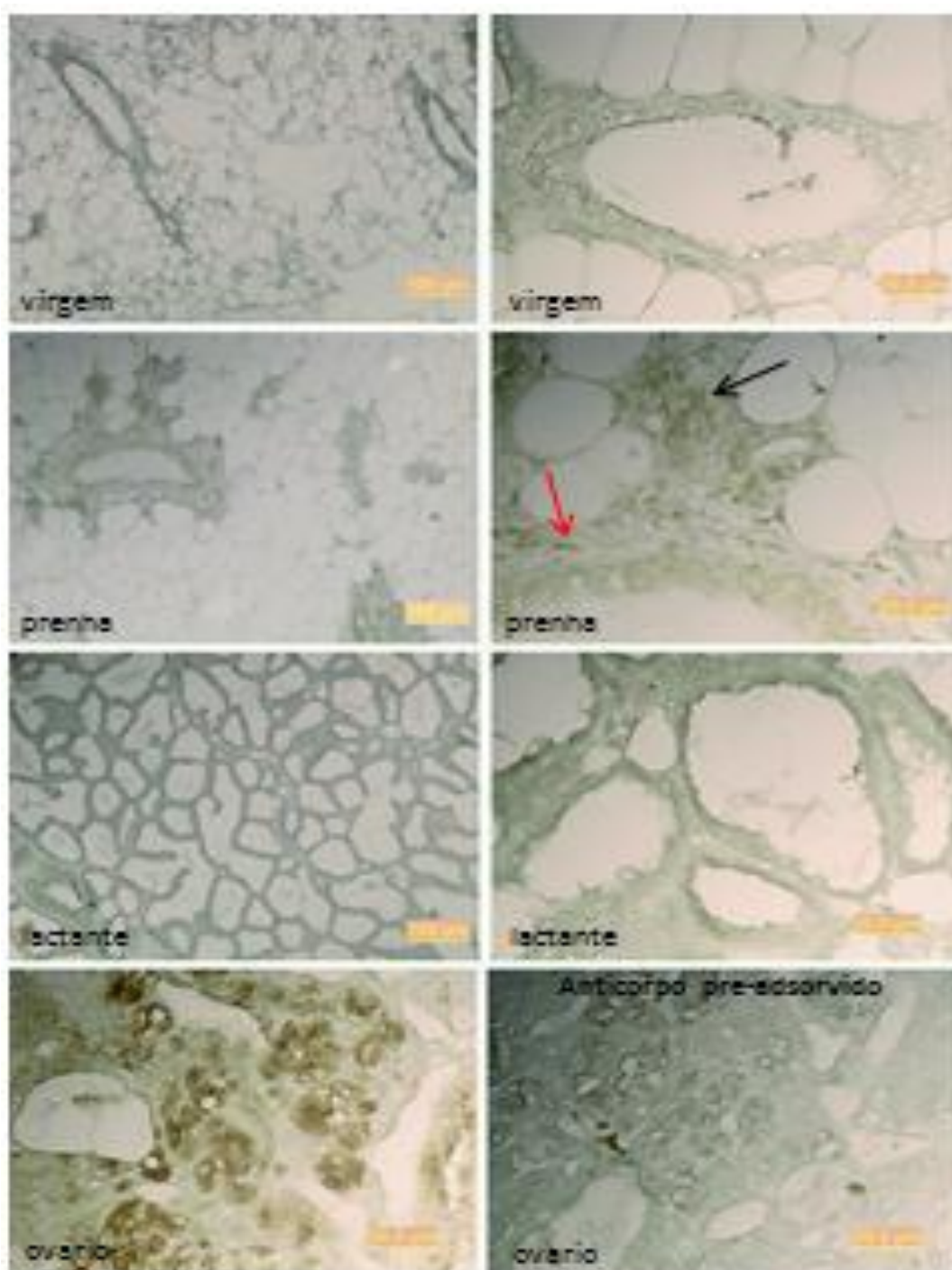


**Figura 16:** Análise de expressão de histona H2A tipo 2-C nas células HC11 cultivadas nos estádios SC-L, PD e DIF, incubado com anti- histona H2A tipo 2-C

e sem anticorpo (controlo negativo) por imunohistoquímica. As setas indicam marcação positiva. Experimento representativo de dois.

#### **4.3 Análise da expressão da histona H2A tipo 2-C em tecido mamário do rato doméstico.**

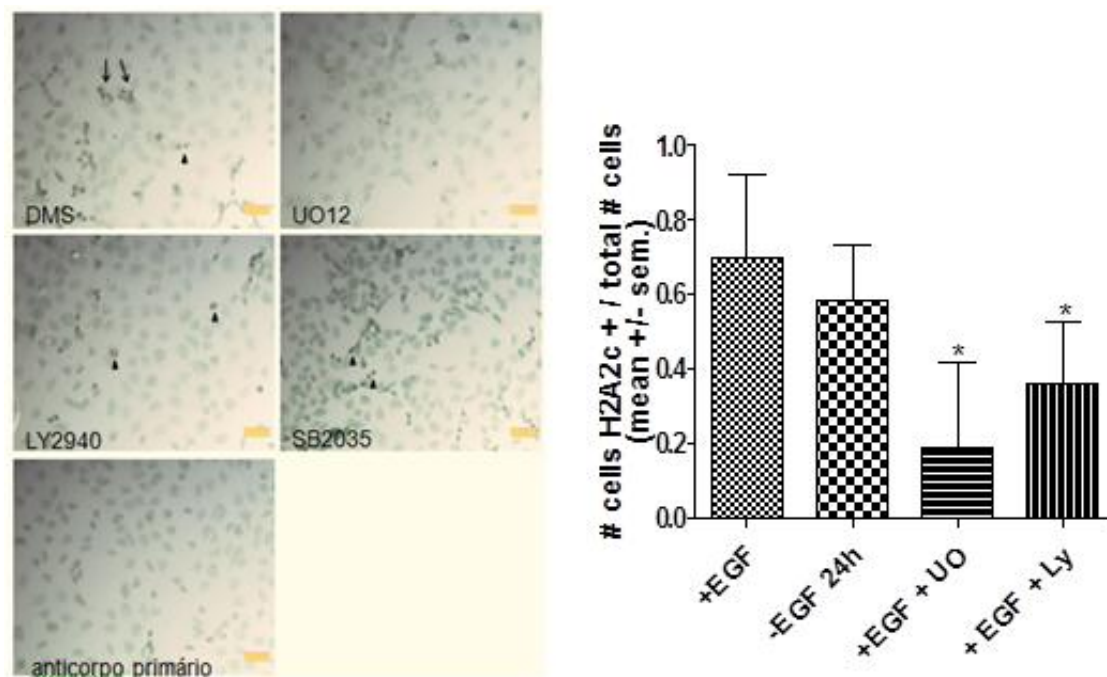
Com o objetivo de estudar se a histona H2A tipo 2-C é também expressa em níveis elevados no tecido mamário no estágio quiescente (virgem), de alta proliferação (prenha) e diferenciado (lactação), utilizou-se a técnica de imunohistoquímica. Estes tecidos foram incubados com anticorpo anti-histona H2A-tipo 2-C e o controlo negativo foi o anticorpo pré-adsorvido com a proteína H2A tipo 2-C recombinante. Como se pode constatar pela Figura 17, obteve-se expressão de histona H2A tipo2-C apenas em estágio prenhã (Setas). Nos outros dois estádios (virgem e lactante) não se verificou a presença da expressão de histona H2A tipo 2-C. Pelos resultados obtidos, resume-se que a expressão desta histona só acontece quando a mama encontra-se no estágio de proliferação em resposta ao estímulo de hormonas gestacionais como progesterona. É de notar que a expansão celular durante o início de prenhez consiste principalmente de células progenitoras/indiferenciadas que na prenhez tardia diferenciam-se pela ação da progesterona+prolactina.



**Figura 17:** Análise de expressão de histona H2A tipo 2-C no tecido mamário de camundongo. Estádios virgem, prenha e lactação. Experimento representativo de 2. **Seta preta** indica marcação epitelial e **seta vermelha** marcação no estroma. O Ovário foi utilizado para confirmar a especificidade do anticorpo.

#### 4.4 Importância das vias de sinalização ERK $\frac{1}{2}$ MAP Kinase, p38- MAP Kinase e via PI3K/AKT na regulação da expressão histona H2A tipo 2-C em células epiteliais mamárias.

As vias PI3K/AKT e MEK $\frac{1}{2}$  /ERK  $\frac{1}{2}$  MAPK kinase têm sido associadas com o controle da proliferação em vários tipos celulares[115]. Quando ativadas afetam uma ampla gama de funções celulares incluindo a proliferação, sobrevivência, motilidade, apoptose e diferenciação. Estas vias de sinalização são estimuladas pelo EGF [82]. A via da p38-MAP kinase regula a diferenciação e apoptoses, e esta via é ativada por estresse e citocinas [116]. Para verificar se as vias MEK $\frac{1}{2}$  /ERK  $\frac{1}{2}$ , PI3K/AKT ou p38-MAPK são determinantes para regular a expressão de histona H2A tipo 2-C em células HC11 foram incubadas as células HC11 em estágio SC-L (com EGF = controlo), com os inibidores específicos destas vias: UO126, inibidor de MEK1; LY294002, inibidor de PI3-K; e SB203580, inibidor de p38-MAP kinase e logo analisou-se os níveis de expressão de histona H2A tipo 2-C por imunocitoquímica (Figura 18)



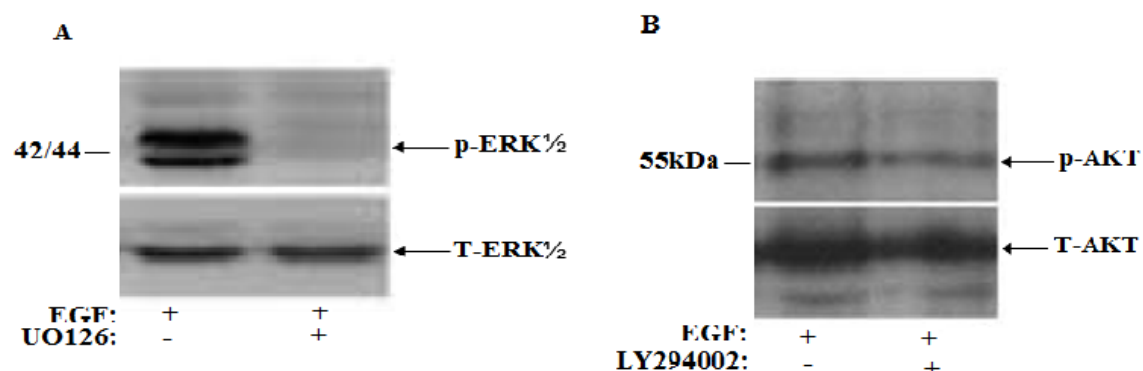
**Figura 18:** Análise do efeito de UO126 na expressão de histona H2A tipo 2-C nas células HC11 tratadas com EGF, EGF+UO126 e EGF+LY29004 e EGF+

SB203580 por 24h, por imunocitoquímica. As setas indicam marcação positiva, cabeça de setas indicam mitoses. Experimento representativo de três. \*  $p < 0.05$

Os resultados obtidos (Figura 18) mostram que as amostras tratadas com EGF, apresentam os níveis mais elevados de expressão, o qual se observa uma diminuição significativa de expressão tanto na amostra tratada com UO126 quanto da amostra tratada com LY942002 e com SB203580. Também observou-se que só a inibição da via MEK $\frac{1}{2}$  / ERK $\frac{1}{2}$  inibiu a proliferação. No entanto, estes resultados indicam que as vias MEK $\frac{1}{2}$  / ERK $\frac{1}{2}$ , PI3K/AKT e ainda P38-cinase ativam a expressão da histona H2A tipo 2-C. Observou-se também que a histona H2A tipo 2-C mantém-se expressa na divisão celular (Figura 18, cabeça de seta), o qual indica, que a expressão desta histona não é dependente do ciclo celular.

No sentido a ser confirmada o efeito dos inibidores em células HC11, propôs-se a fazer a análise utilizando Western Blot, sendo que para tanto, as células foram tratadas com EGF, e com UO126 e LY294002. Como se pode observar na Figura 19A, existe uma ausência de fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$  na amostra tratada com EGF + UO126 e a Figura 19B mostra diminuição de fosforilação de AKT na amostra tratada com EGF+LY29004. Estes resultados sugerem que em nossas culturas, as concentrações de inibidores utilizadas conseguiram inibição da ativação da ERK $\frac{1}{2}$  e da AKT, o que corrobora a participação destas vias na expressão histona H2A tipo 2-C.



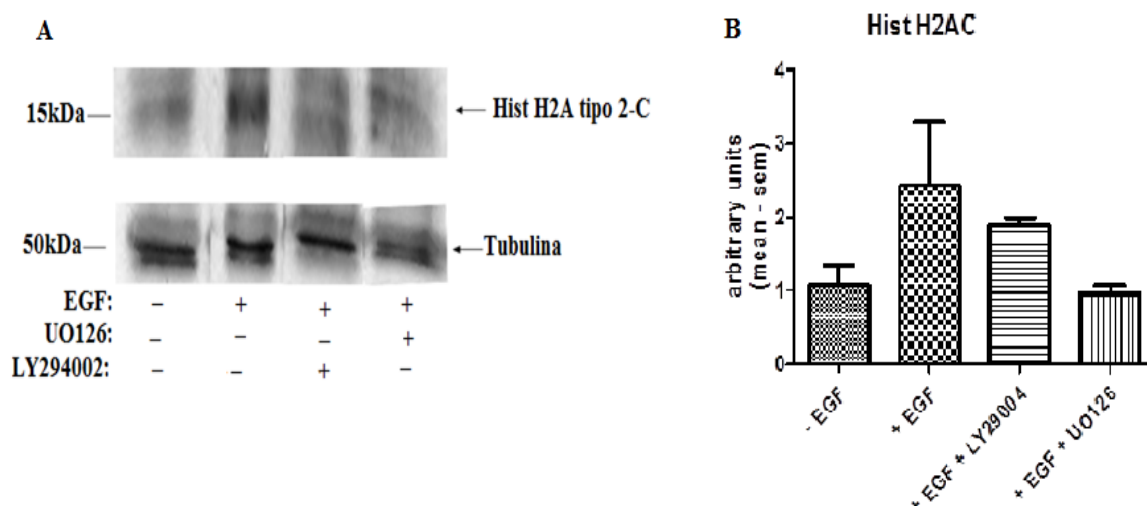


**Figura 19.** Os efeitos dos inibidores UO126 (1  $\mu$ M) e LY294002 (3  $\mu$ M) por 24h nas células HC11 + EGF. (A) ativação de ERK $\frac{1}{2}$  (B) ativação de AKT por Western Blot. p-: fosforilado; t-: total.

#### 4.5 Expressão de histona H2A tipo 2-C em células de cancro da mama humana.

Em termos de expressão génica, as células HC11 no estágio SC-L apresentam similaridades com as células de cancro da mama do tipo basal/triplo negativo [112]. Com o intuito de estudar a expressão de histona H2A tipo 2-C em células MDA-MB-231 de tipo basal (pouco diferenciadas), decidiu-se analisar o extrato total de células tratadas com EGF, sem EGF, com EGF+LY29004 e com EGF+UO126, por Western Blot. Como esperado, os resultados obtidos (Figura 20) confirmam que nas células MDA-MB-231 pouco diferenciadas a expressão da histona H2A tipo 2-C atingiu níveis máximos após tratamento com EGF, diminuição para níveis similares ao das células sem EGF, no grupo tratado com EGF+UO126 ou com EGF+LY29004.

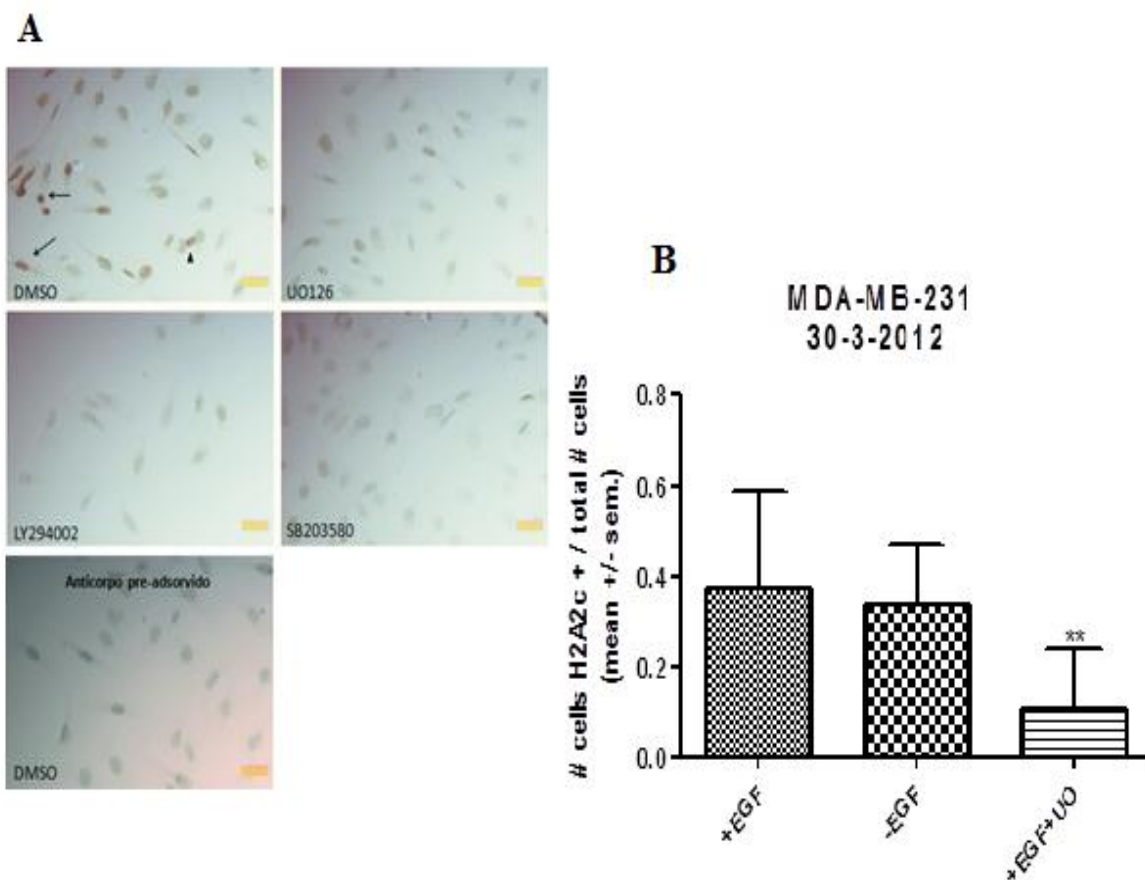




**Figura 20:** A comparação da expressão da H2A tipo 2-C de amostras das células MDA-MB-231 tratadas com e sem EGF (+EGF e – EGF, respetivamente) e com inibidores específicos (UO126 inibidor ERK $\frac{1}{2}$  e LY29004 inibidor AKT). Essas amostras foram incubadas com anticorpo anti-Hist 2H2AC. (A) blot representativo da expressão da histona H2A tipo 2-C nas diferentes condições de tratamento. (B) Análise quantitativa dos resultados. Os resultados foram normalizados pela intensidade da banda de tubulina e posteriormente ao valor correspondente as células – EGF e são a média e repetitivo sem (n=2).

A expressão de histona H2A tipo 2-C em células MDA-MB-231 tratadas com EGF, sem EGF, e com EGF mas UO126, LY29004 ou SB203580 foi também avaliada por imunocitoquímica (Figura 21), onde verificou-se a expressão. Comparativamente a amostra com EGF (controlo), observou-se em células tratadas sem EGF por 24h uma diminuição da expressão muito pequena (não se mostra). Como esperado, na amostra com EGF + inibidores verificou-se uma diminuição significativa na expressão de histona H2A tipo 2-C. Esses resultados sugerem que a ativação da via MEK $\frac{1}{2}$  /ERK $\frac{1}{2}$ , PI3K/AKT ou p38-MAPK é necessária para manter a expressão da histona H2A tipo 2-C tanto em células de camundongo não tumorigénicas HC11 como nas células de cancro de mama humanas MDA-MB-231 e, indicam um mecanismo geral e não específico da espécie. É de notar que o efeito da retirada do EGF do meio por 24h (-EGF) na

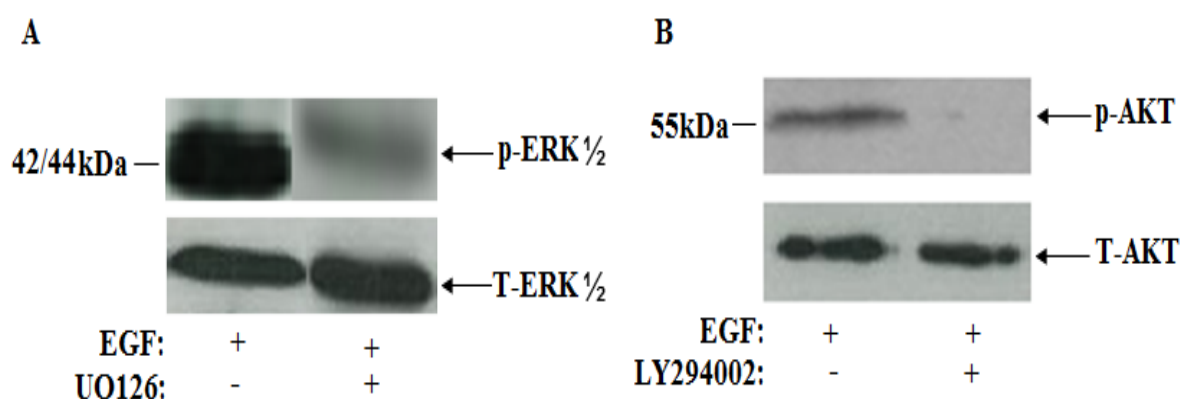
diminuição da expressão não foi significativo, provavelmente devido a níveis altos de ativação do EGFR em condições basais nestas células.



**Figura 21:** Análise de efeito de UO126 (inibidor de MEK  $\frac{1}{2}$ ), Ly294002 (inibidor de PI3K) e SB203580 (inibidor de p38 MAPK) na expressão de histona H2A2C nas células MDA-MB-231 tratadas com EGF (A) As células foram tratadas 24h. (B) Análise semi- quantitativo mostra o número de células com expressão de histona H2A tipo 2-C. Imagens e contagem representativos de 2 experimentos. \*\*  $p < 0.05$ .

Como controlo de nosso sistema experimental, analisamos os níveis de fosforilação de ERK  $\frac{1}{2}$  e AKT por imunoblot com extratos totais de células MDA-MB-231, verificamos o efeito dos inibidores na inibição da ativação de ditas vias (Figura 22). Para isso, as células foram cultivadas com EGF e com iguais concentrações de inibidores específicos (UO126 inibidor MEK $\frac{1}{2}$ , Ly294002 inibidor PI3K) usados para o estudo da expressão da histona H2A tipo 2-C.

Observamos na figura 22A, que o inibidor MEK $\frac{1}{2}$  diminuiu de forma significativo os níveis de fosforilação ERK $\frac{1}{2}$  comparativamente ao estágio sem inibidor (controle +EGF), e no caso de figura 22B mostra uma total inibição de fosforilação de AKT induzida por inibidor PI3K. Estes resultados sugerem que ambos os inibidores UO126 e Ly294002 inibem a ativação das ERK  $\frac{1}{2}$  e AKT respetivamente e consequentemente também a expressão de histona H2A tipo 2-C em ambos os tipos células em estudos (HC11 e MDA-MB-231).



**Figura 22:** Os efeitos de inibição de MEK 1/2 e PI3K, pelos inibidores UO126 (1 $\mu$ M) e Ly294002 (3 $\mu$ M), respetivamente. As células MDA-MB-231 foram incubadas por 24h com EGF com e sem inibidores. Utilizou-se 50 $\mu$ g extrato totais, separado em SDS-PAGE 10%. As membranas foram incubadas com anticorpos anti p-ERK $\frac{1}{2}$  e anti-p-AKT. Os níveis totais de AKT e ERK $\frac{1}{2}$  foram usados com controlo.

## 5 Discussão

O presente estudo teve o propósito de analisar a expressão de histona H2A tipo 2-C em células epiteliais mamárias em distintos estádios de diferenciação numa linha celular não tumorigénica e numa linha de cancro de mama de tipo basal. A histona H2A tipo 2-C foi identificada por espetrometria de massa em células HC11 não diferenciadas (SC-L) [117], mas não existe informação sobre sua expressão ou efeitos na expressão génica. Ainda, existem poucos anticorpos para histona H2A tipo 2-C e deve-se primeiro proceder à validação dos mesmos. De facto, até o momento deste trabalho, só existe o anticorpo utilizado por nós.

Neste trabalho foi detetada a expressão de histona H2A tipo 2-C em ambos os modelos celulares (HC11 e MDA-MB-231) com duas técnicas complementares: Western Blot e imunocitoquímica. O anticorpo resultou muito mas específico para uso em técnica de imunocitoquímica em comparação com Western Bolt.

A análise de expressão histona H2A tipo 2-C na proliferação e diferenciação de células epiteliais de mama HC11 permite observação da expressão de histona H2A tipo 2-C apenas no estágio de SC-L onde as células proliferam ativamente e estão em um estágio pouco diferenciado. A expressão de histona H2A tipo 2-C foi também verificada em células MDA-MB-231 de cancro de mama tipo basal que é muito indiferenciado e também apresenta similaridades com células estaminais [112]. Tanto as células HC11 SC-L como as MDA-MB-231 expressam recetores de EGF (EGFR). No caso das células HC11, a ativação do EGFR é estimulada pela incubação com EGF e no caso das células MDA-MB-231 já apresenta níveis de ativação basal mais elevados que outras células de cancro [118]. O EGF, necessário para a proliferação de células epiteliais normais da mama, tem sido demonstrado que inibe a diferenciação lactogénica em células HC11 epiteliais mamárias, tanto *in vitro* como *in vivo* [119, 120].

A ativação do EGFR pelo EGF resulta na ativação das vias de sinalização MEK 1/2 / ERK 1/2 e PI3-K / AKT. No presente trabalho investigou-se a importância destas vias de sinalização. Os resultados demonstraram que a expressão de

histona H2A tipo 2-C é induzida durante a proliferação celular estimulada por EGF e requer ativação de ERK ½ e AKT.

AKT estimula a sobrevivência celular através de uma diminuição da relação Bad/Bcl-2 e também pode estimular a proliferação [121, 122]. Os resultados indicam que nas células HC11, a inativação de AKT ainda que não inibiu a proliferação celular (vem-se muitas mitoses na imunocitoquímica) diminuiu a expressão de histona H2A tipo 2-C tanto em células HC11 como em células MDA-MB-231.

A via da p38-MAPK ativada por citocinas é importante na diferenciação celular e na expressão de beta caseína induzida por prolactina [102]. Recentemente, a ativação de p38-MAPK tem sido mostrada como genes supressores de tumor [123] visto que a sua função em opor a efeitos proliferativos da via Ras-MAPK /ERK e levar a interrupção do crescimento ativa a apoptose e dormência em tumores [124].

Assim, os resultados observados nas células HC11 e MDA-MB-231 não estão de acordo com o esperado: inibição da p38-MAPK = incrementa nos níveis de histona H2A tipo 2-C. Mas deve-se ter em conta que a sobre-ativação desta via está associada a tumor de mama e aumento da sobrevivência das células HC11 [125]. Os resultados obtidos neste estudo sugerem, portanto, que em células pouco diferenciadas, níveis básicos de p38 são necessários para manter a expressão de histona H2A tipo 2-C, enquanto relativamente ao efeito da ativação de p38 em células diferenciadas (DIF) na expressão de histona H2A tipo 2-C (i.e. inibição) ainda deverá ser estudado.

Neste estudo também constatou-se a expressão de histona H2A tipo 2-C no tecido mamário de rato doméstico prenha, um estágio de alta proliferação de células indiferenciadas devido a presença de hormonas gestacionais que confirmam a expressão de histona H2A tipo 2-C mas longe da cultura celular.

Em suma, o conjunto de resultados sugere que a expressão da histona H2A tipo 2-C está associada a estádios celulares pouco diferenciados e depende da ativação de vias de sinalização celular envolvidas na ativação da proliferação e sobrevivência e que são alvos da transformação celular.

## 6 Referência bibliográficas

1. Hennighausen, L. and G.W. Robinson, *Signaling Pathways in Mammary Gland Development*. Developmental Cell, 2001. **1**: p. 467–475.
2. Vinay, K., et al., *Pathologic Basis of Disease*, ed. 7th2005, Elsevier: Philadelphia.
3. Guyton, A.C., *Tratado de Fisiologia Médica*. 9 Edição, ed. G. KOOGANsd.
4. Van Keymeulen, A., et al., *Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance*. Nature, 2011. **479**(7372): p. 189-193.
5. DC, A., B. P, and M. D, *The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer*. Breast Cancer Res., 2004. **6** 2004 Sep **22**.(6).
6. Lewis, M.T., *Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia*. Breast Cancer Res 2000, 2000. **2**: p. 158-169.
7. Warri, A.M., N.M. Saarinen, and S.I. Makela, *Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention?* Horm Res, 2007. **68**(5): p. 248-60.
8. Ferlay J, S.H., Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. , *Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase GLOBOCAN 2008*, 2010. **No. 10** [Internet].(Lyon (France): IARC; 2010,).
9. Visvader, J.E., *Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis*. Genes Dev, 2009. **23**(22): p. 2563-77.
10. World Health Organization. *Câncer*. 2011 [cited 2011 29 de Novembro]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
11. Inca. *Câncer*. In: *Secretaria de atenção à Saúde* 2011; Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento/>.
12. Smalley, M. and A. Ashworth, *Stem cells and breast cancer: A field in transit*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 832-44.
13. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
14. Stoler, D.L., et al., *The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression*. PNAS, 1999. **96**(26): p. 15121–15126.
15. Rubin, H., *The role of selection in progressive neoplastic transformation*. Foundations of cancer resarch 2001. **83**: p. 159-209.
16. AM, S., et al., *Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer*.Santos European Journal of Cancer, 2006. **42**(7).
17. <peters-2001.pdf>.
18. Jyothish, B., et al., *DNA repair proficiency: a potential marker for identification of high risk members in breast cancer families*. Cancer Letters, 1998. **124**(1): p. 9-13.
19. Dapic, V., M.A. Carvalho, and A.N.A. Monteiro, *Breast Cancer Susceptibility and the DNA Damage Response*. Cancer Control, 2006. **12**.
20. P.Jackson, S., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. carcinogenesis, 2002. **23**.
21. Alison, M.R., et al., *An introduction to stem cells*. The Journal of Pathology, 2002. **197**(4): p. 419-423.
22. Dontu, G., D. El-Ashry, and M.S. Wicha, *Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor*. TRENDS in Endocrinology and Metabolism, 2004. **15**(5).
23. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression*. Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**.
24. Kalluri, R., *EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1417-9.
25. Amatori, S., et al., *DNA demethylating antineoplastic strategies: a comparative point of view*. Genes Cancer, 2010. **1**(3): p. 197-209.
26. Momparler, R.L., *Cancer epigenetics*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6479-83.
27. Andrew P. Feinberg, R. Ohlsson, and S. Henikoff, *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nature Reviews Genetics, 2006. **7**: p. 21-33 (January 2006).
28. Yuan, Y., et al., *Reactivation of SYK expression by inhibition of DNA methylation suppresses breast cancer cell invasiveness*. Int J Cancer, 2005. **113**(4): p. 654-9.
29. Cai, F.F., et al., *Epigenetic therapy for breast cancer*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(7): p. 4465-87.

30. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. CMAJ, 2006. **174**(3): p. 341-8.
31. Gal-Yam, E.N., et al., *Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy*. Annu Rev Med, 2008. **59**: p. 267-80.
32. Esteller, M., *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. Oncogene, 2002. **21**.
33. Tommasi, S., et al., *Methylation of homeobox genes is a frequent and early epigenetic event in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(1): p. R14.
34. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
35. Shilatifard, A., *Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression*. Annual Review of Biochemistry, 2006. **75**: p. 243-269.
36. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. Cell, 2007. **128**(4): p. 707-19.
37. Linggi, B.E., et al., *Translating the histone code into leukemia*. J Cell Biochem, 2005. **96**(5): p. 938-50.
38. Santos-Rosa, H. and C. Caldas, *Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2381-402.
39. Allegrucci, C., et al., *Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts*. Molecular Cancer, 2011. **10**.
40. AG, I. and L.T. NB, *Chromatin control and cancer-drug discovery: realizing the promise*. Drug Discov Today, 2006. **11**(3-4): p. 97-109.
41. van Haaften, G., et al., *Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 521-3.
42. Benson, L.J., et al., *Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9287-96.
43. D., W., *Mechanisms of disease: epigenesis*. Semin Pediatr Neurol., 2007. **14**(1): p. 7-14.
44. Sterner, D.E. and S.L. Berger, *Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors*. Microbiology and molecular biology 2000. **64**(2): p. 435-459.
45. Ropero, S. and M. Esteller, *The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer*. Mol Oncol, 2007. **1**(1): p. 19-25.
46. Santos-Rosa, H., et al., *Methylation of Histone H3 K4 Mediates Association of the Isw1p ATPase with Chromati*. Molecular Cell, 2003. **12**: p. 1325-1332.
47. Peters, A.H.F.M., et al., *Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin*. Molecular Cell, 2003. **12**.
48. Kunju, L.P., et al., *EZH2 and ALDH-1 mark breast epithelium at risk for breast cancer development*. NIH Public Access, 2011. **24**(6).
49. MR, H. and S. DL., *Role of H3K27 Demethylases Jmjd3 and UTX in Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **75**: p. 43-9.
50. Elsheikh, S.E., et al., *Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3802-9.
51. Hake, S.B., A. Xiao, and C.D. Allis, *Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer*. Br J Cancer, 2004. **90**(4): p. 761-9.
52. Walter, B.A., et al., *miR-21 Expression in Pregnancy-Associated Breast Cancer: A Possible Marker of Poor Prognosis*. Journal of Cancer, 2011. **2**: p. 67-75.
53. Tavazoie, S.F., et al., *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 147-52.
54. Song, H. and G. Bu, *MicroRNA-205 inhibits tumor cell migration through down-regulating the expression of the LDL receptor-related protein 1*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(2): p. 400-5.
55. Kutanzi, K.R., et al., *MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer*. Clin Epigenetics, 2011. **2**(2): p. 171-185.
56. Ahmad, K. and S. Henikoff, *Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99 Suppl 4**: p. 16477-84.
57. Nashun, B., et al., *Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice*. Development, 2010. **137**(22): p. 3785-94.
58. Dickey, J.S., et al., *H2AX: functional roles and potential applications*. Chromosoma, 2009. **118**(6): p. 683-92.

59. Rangasamy\*, D., *Histone Variant H2A.Z Can Serve as a New Target for Breast Cancer Therapy*. Current Medicinal Chemistry, 2010. **17**: p. 3155-3161.
60. Redona, C., et al., *Histone H2A variants H2AX and H2AZ*. Genetics & Development, 2002. **12**(2): p. 162-169.
61. Thambirajah, A.A., et al., *New developments in post-translational modifications and functions of histone H2A variants*. Biochemistry and Cell Biology, 2009. **87**(1): p. 7-17.
62. Kalocsay, M., N.J. Hiller, and S. Jentsch, *Chromosome-wide Rad51 Spreading and SUMO-H2A.Z-Dependent Chromosome Fixation in Response to a Persistent DNA Double-Strand Break*. Molecular Cell, 2009. **33**(3): p. 335-343.
63. Sarcinella, E., et al., *Monoubiquitylation of H2A.Z Distinguishes Its Association with Euchromatin or Facultative Heterochromatin*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(18): p. 6457-6468.
64. Thambirajah, A.A., et al., *H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20036-44.
65. Marques, M., et al., *Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription*. Epigenetics 2010. **5**(4 ): p. 267-272.
66. Dryhurst, D., et al., *Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates*. BMC Biol, 2009. **7**: p. 86.
67. Gevry, N., et al., *p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z*. Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1869-81.
68. Hua, S., et al., *Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression*. Mol Syst Biol, 2008. **4**: p. 188.
69. Greaves, I.K., et al., *H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 525-30.
70. Campisi, J., *Suppressing cancer: the importance of being senescent*. Science, 2005. **309**(5736): p. 886-7.
71. Cha, H., et al., *Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response*. Cancer Res, 2010. **70**(10): p. 4112-22.
72. Toyooka, T., T. Kubota, and Y. Ibuki, *Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX*. Mutat Res, 2011.
73. Wen, W., et al., *MST1 promotes apoptosis through phosphorylation of histone H2AX*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 39108-16.
74. Yuan, G. and B. Zhu, *Histone variants and epigenetic inheritance*. Biochim Biophys Acta, 2011.
75. Newsham, I.F., *The Long and Short of Chromosome 11 in Breast Cancer*. American Journal of Pathology, 1998. **153**(1): p. 5-9.
76. Shete, S., et al., *Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma*. Nat Genet, 2009. **41**(8): p. 899-904.
77. Celeste, A., et al., *Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX*. Science, 2002. **296**: p. 922-927.
78. Bassing, C.H., et al., *Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8173-8.
79. Lal, A., et al., *miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(5): p. 492-8.
80. Kapoor, A., et al., *The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1105-9.
81. Gonzalez-Romero, R., et al., *Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd*. Gene, 2008. **413**(1-2): p. 1-7.
82. Katz, M., I. Amit, and Y. Yarden, *Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1161-76.
83. Lee, H. and W. Bai, *Regulation of Estrogen Receptor Nuclear Export by Ligand-Induced and p38-Mediated Receptor Phosphorylation*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(16): p. 5835-5845.
84. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 55-72.
85. Federico Mayor, J., et al., *Interfering with MAP Kinase Docking Interactions Implications and Perspective for the p38 Route*. Cell Cycle, 2007. **6**(5): p. 528-533.
86. Kane, L.P., J. Lin, and A. Weiss, *Signal transduction by the TCR for antigen*. Current Opinion in Immunology, 2000. **12**(3).
87. Chong, H., H.G. Vikisa, and K.-L. Guan, *Mechanisms of regulating the Raf kinase family*. Cellular Signalling, 2003. **15**(5): p. 463-469.



88. Brown, M.D. and D.B. Sacks, *Protein scaffolds in MAP kinase signalling*. Cell Signal, 2009. **21**(4): p. 462-9.
89. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
90. Paez, J. and W. Sellers, *PI3K/PTEN/Akt Pathway. A critical mediator of oncogenic signaling*. Cancer Treatment and Research, 2004. **115**
91. Hirsch, E., C. Costa, and E. Ciruolo, *Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling*. J Endocrinol, 2007. **194**(2): p. 243-56.
92. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2005. **9**(1): p. 59-71.
93. Maeda, S. and M. Omata, *Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation*. Cancer Sci, 2008. **99**(5): p. 836-42.
94. Kane, L.P., et al., *Induction of NF-kB by the Akt/PKB kinase*. Current Biology, 1999. **9**.
95. Nebreda, A.R. and A. Porras, *p38 MAP kinases: beyond the stress response*. Trends in Biochemical Sciences, 2000. **25**(6).
96. Sanza, V., I. Arozarena, and P. Crespo, *Distinct carboxy-termini confer divergent characteristics to the mitogen-activated protein kinase p38 $\alpha$  and its splice isoform Mxi2*. FEBS Letters, 2000. **474**(2-3).
97. Cuenda, A. and S. Rousseau, *p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8).
98. Mittelstadt, P.R., et al., *Activating p38 MAPK New Tricks for an Old Kinase*. Cell Cycle, 2005. **4**(9).
99. Bulavin, D.V. and A.J.F. Jr, *p38 MAP Kinase's Emerging Role as a Tumor Suppressor*. Advances in Cancer Research, 2004. **92**.
100. Hui, L., et al., *p38 $\alpha$ : A Suppressor of Cell Proliferation and Tumorigenesis*. Cell Cycle, 2007. **6**(20).
101. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-49.
102. Pauloin, A. and E. Chanat, *Prolactin and epidermal growth factor stimulate adipophilin synthesis in HC11 mouse mammary epithelial cells via the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(5): p. 987-96.
103. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem. J., 2003. **374**.
104. Jr., J.E.D., *STATs and Gene Regulation*. Science, 1997. **277**.
105. Reichardt, H.M., et al., *Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities*. European Journal of Endocrinology, 2001. **145**
106. Desrivieres, S., et al., *Comparative proteomic analysis of proliferating and functionally differentiated mammary epithelial cells*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(10): p. 1039-54.
107. Wagner, K.-U. and J.W. Schmidt, *The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer*. Journal of Carcinogenesis, 2011. **10**(32).
108. Ball, R.K., et al., *Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line*. The embo journal, 1988. **7**(7).
109. Taverna, D., B. Groner, and N.E. Hynes, *Epidermal Growth Factor Receptor, Platelet-derived Growth Factor Receptor, and c-erbB-2 Receptor Activation All Promote Growth but Have Distinctive Effects upon Mouse Mammary Epithelial Cell Differentiation*. Cell Growth & Differentiation 1991. **2**.
110. Topper, Y.J. and C.S. Freeman, *Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland*. Physiol Rev, 1980. **60**(4).
111. Danielson, K.G., et al., *Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**.
112. Williams, C., et al., *Gene expression in murine mammary epithelial stem cell-like cells shows similarities to human breast cancer gene expression*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(3): p. R26.
113. Shan, L., et al., *2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) Modulates Lactogenic Hormone-mediated Differentiation and Gene Expression in HC11 Mouse Mammary Epithelial Cells*. Cel Growth& Differentiation, 2001. **12**: p. 649-656.
114. Olsen, H., et al., *Effects of hyperactive Janus kinase 2 signaling in mammary epithelial cells*. Biochemical and Biophysich Research Communication 2002. **296**: p. 139 - 144.
115. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet. , 2006. **7**(8): p. 606-19.

116. Ono, K. and Jiahuai Han, *The p38 signal transduction pathway: activation and function*. Cellular Signalling, 1999. **12**(1).
117. Cardoso, H.B., Marcadores epigenéticos em células HC11 diferenciadas e não diferenciadas, in *Departamento de Química* 2010, Aveiro.
118. Howlin, J., J. Rosenkvist, and T. Andersson, *TNK2 preserves epidermal growth factor receptor expression on the cell surface and enhances migration and invasion of human breast cancer cells*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(2): p. R36.
119. Hynes, N.E., et al., *Epidermal Growth Factor Receptor, but Not c-erbB-2, Activation Prevents Lactogenic Hormone Induction of the I-Casein Gene in Mouse Mammary Epithelial Cells*. Molecular and cellular biology, 1990: p. 4027-4034.
120. Cerrito, M.G., et al., *Ras dominantes negativos Mejora lactogénica hormonal diferenciación inducida por la activación de bloqueo de la vía de señalización de Raf-MEK-ERK Transducción* J Physiol Cell 2004. **201**(2).
121. Datta, S.R., et al., *Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery*. Cell 1997. **91**(2): p. 231-241.
122. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev. , 1999. **13** p. 2905-2927.
123. Brancho, D., et al., *Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo*. Genes Dev, 2003. **17**(16): p. 1969-78.
124. Aguirre-Ghisso, J.A., L. Ossowski, and S.K. Rosenbaum, *Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7336-45.
125. Lofgren, K.A., et al., *Mammary gland specific expression of Brk/PTK6 promotes delayed involution and tumor formation associated with activation of p38 MAPK*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(5): p. R89.